

50X1-HUM

Page Denied

PROCESSING COPY

INFORMATION REPORT INFORMATION REPORT

CENTRAL INTELLIGENCE AGENCY

This material contains information affecting the National Defense of the United States within the meaning of the Espionage Laws, Title 18, U.S.C. Secs. 793 and 794, the transmission or revelation of which in any manner to an unauthorized person is prohibited by law.

50X1-HUM

C-O-N-F-I-D-E-N-T-I-A-L

COUNTRY	USSR	REPORT	
SUBJECT	Publication of the Academy of Sciences on Vitamin Research	DATE DISTR.	26 December 1956
		NO. PAGES	1
		REQUIREMENT NO.	RD
DATE OF INFO.		REFERENCES	
PLACE & DATE ACQ.			

Reel # 78
50X1-HUM
50X1-HUM

SOURCE EVALUATIONS ARE DECLASSIFIED

unclassified

Soviet periodical, published in 1955 by the Institute for Biochemistry of the Academy of Sciences of the USSR. The periodical was edited by Microbiologist Professor V.N. Bukin, is entitled Vitaminnyye Resursy i ikh Ispolozovaniye (Vitamin Resources and their Utilization), and contains articles in Russian on Soviet scientific research on the topic Metody Opredeleniya Vitaminov (Methods for the Determination of Vitamins).

50X1-HUM

C-O-N-F-I-D-E-N-T-I-A-L

50X1-HUM

STATE	X	ARMY	X	NAVY	X	AIR	X	FBI		AEC					
-------	---	------	---	------	---	-----	---	-----	--	-----	--	--	--	--	--

(Note: Washington distribution indicated by "X"; Field distribution by "#".)

INFORMATION REPORT INFORMATION REPORT

А К А Д Е М И Я Н А У К С С С Р

ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А. Н. БАХА

ВИТАМИННЫЕ РЕСУРСЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

СБОРНИК ТРЕТИЙ

МЕТОДЫ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНОВ



ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА — 1955

ОТВЕТСТВЕННЫЙ РЕДАКТОР
В. Н. Буккин

ПРЕДИСЛОВИЕ

Весьма большое количество опубликованных методов определения витаминов и различных модификаций этих методов делает затруднительным выбор наиболее подходящих из них при постановке новых исследований. В связи с этим к нам поступают многочисленные запросы о рекомендации тех или иных методик, и многие научные работники, приезжающие с периферии, знакомятся с ними в нашей лаборатории. Особенно это касается микробиологических методов определения и тех оригинальных химических методов, которые разработаны в лаборатории витаминов Института биохимии им. А. И. Баха АН СССР, но не получили еще широкого распространения.

Указанное обстоятельство побудило нас обобщить накопившийся опыт лабораторных исследований и дать подробное описание методов, каждый из которых потребовал критического обоснования и проверки, а в ряде случаев специальной разработки.

К числу последних относятся химические методы определения витаминов D, B₂, B₁₂ и фолиевой кислоты, микробиологические методы определения витамина B₆ и пантотеновой кислоты (выполнены в лаборатории проф. М. Н. Мейселя в Институте микробиологии АН СССР) и биологический метод определения активности веществ, обладающих Р-витаминным действием. К числу подобных работ должна быть отнесена и работа по подбору специфического адсорбента отечественной марки для витамина B₁, что важно для широкого внедрения химического метода определения этого витамина.

Хроматографический метод анализа на бумаге является, как известно, весьма перспективным, однако в применении к витаминам он сравнительно мало разработан. Одним из ограничивающих обстоятельств здесь является относительно малая доступность препаратов чистых витаминов и особенно их

ОТВЕТСТВЕННЫЙ РЕДАКТОР
В. Н. Букин

ПРЕДИСЛОВИЕ

Весьма большое количество опубликованных методов определения витаминов и различных модификаций этих методов делает затруднительным выбор наиболее подходящих из них при постановке новых исследований. В связи с этим к нам поступают многочисленные запросы о рекомендации тех или иных методов, и многие научные работники, приезжающие с периферии, знакомятся с ними в нашей лаборатории. Особенно это касается микробиологических методов определения и тех оригинальных химических методов, которые разработаны в лаборатории витаминов Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, но не получили еще широкого распространения.

Указанное обстоятельство побудило нас обобщить накопившийся опыт лабораторных исследований и дать подробное описание методов, каждый из которых потребовал критического обоснования и проверки, а в ряде случаев специальной разработки.

К числу последних относятся химические методы определения витаминов D, B₂, B₁₂ и фолиевой кислоты, микробиологические методы определения витамина B₆ и пантотеновой кислоты (выполнены в лаборатории проф. М. Н. Мейселя в Институте микробиологии АН СССР) и биологический метод определения активности веществ, обладающих Р-витаминным действием. К числу подобных работ должна быть отнесена и работа по подбору специфического адсорбента отечественной марки для витамина B₁, что важно для широкого внедрения химического метода определения этого витамина.

Хроматографический метод анализа на бумаге является, как известно, весьма перспективным, однако в применении к витаминам он сравнительно мало разработан. Одним из ограничивающих обстоятельств здесь является относительно малая доступность препаратов чистых витаминов и особенно их

производных, применяющихся в качестве «свидетелей» или «метчиков».

В данном сборнике помещается заново разработанный метод хроматографического разделения на бумаге провитаминов и витаминов группы D и метод разделения свободного рибофлавина, его мононуклеотида и динуклеотида.

В приложении к сборнику дается краткое описание уже известных методов определения аскорбиновой кислоты и каротина в том виде, в каком они применяются в нашей лаборатории.

Мы полагаем, что издание сборника облегчит задачу подбора и пользования необходимыми методами и тем самым будет способствовать дальнейшему развитию отечественных витаминологических исследований.

Заранее приносим благодарность всем лицам, которые своими критическими замечаниями по поводу рекомендуемых методов способствовали бы их дальнейшему усовершенствованию.

Доктор биологических наук В. Н. Букин

И. Н. ГАРКИНА

ХИМИЧЕСКИЙ И СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА А

Основные методы определения витамина А — спектроскопический и химический; последний основан главным образом на цветной реакции витамина А с треххлористой сурьмой и реже с глицериддихлоргидрином. Реакция с глицериддихлоргидрином при большей стабильности получаемого цветного продукта значительно менее чувствительна, и в силу этого применение ее не получило широкого распространения.

Среди методов определения витаминов — определение витамина А является наиболее сложным. Биологические методы недостаточно чувствительны и требуют большого количества животных для получения статистически достоверных результатов. Применение же более доступных — химических и спектроскопических — методов связано с рядом затруднений, обусловленных присутствием в испытуемых материалах сопутствующих примесей, искажающих результаты определений.

Во избежание этих затруднений в нашей лаборатории применяется сочетание химического и спектроскопического методов определения витамина А, наряду с контрольной проверкой результатов определения посредством биологических опытов.

На основании накопленного материала ниже приведено описание хода анализа витамина А в природных продуктах в том виде, в каком он применяется в нашей лаборатории. Предварительно в кратком виде излагаются основные свойства самого витамина А и отдельных его форм, показывающие сложность анализа и условность существующих методов определения этого витамина.

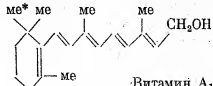
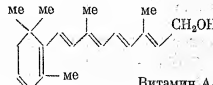
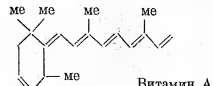
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИТАМИНА А

Под витамином А следует подразумевать не одно вещество, а группу веществ, обладающих общностью основной структуры

кристаллического препарата, но возможно, что и эта активность обуславливается наличием примеси непрореагировавшего витамина A_1 .

Таблица 2

Сравнительная характеристика ацетатов витаминов A_1 , A_2 и A_3

Химическая формула витаминов	Максимум экстинкции $E_{1\%}^{1\text{см}}$ в этиловом спирте	
	Ацетаты витаминов A_1 и A_2	Продукты реакции с $SbCl_5$
 Витамин A_1	при 328 $m\mu$ = 1700	при 620 $m\mu$ = 5000
 Витамин A_2	при 351 $m\mu$ = 1460 при 287 $m\mu$ = 820	при 623 $m\mu$ = 4100
 Витамин A_3	при 351 $m\mu$ = 2540 при 371 $m\mu$ = 3680 при 392 $m\mu$ = 3200	при 620 $m\mu$ = 5500

* ме означает всюду метильную группу —CH₃.

Стандарты витамина A_1

В 1934 г. на Международной конференции по стандартизации витаминов было принято решение измерять активность известной в то время лишь одной формы витамина А по чистому β-каротину, причем 1 интернациональная единица была приравнена биологической активности 0,6 гаммы β-каротина.

В 1949 г., в связи с получением чистого синтетического ацетата витамина A_1 , устойчивого при хранении, в качестве стандарта был принят растворенный в хлопковом масле ацетат этого витамина с содержанием его 3,44 мг в 1 г масла.

Одна интернациональная единица была приравнена активности 3,44 гаммы ацетата или 0,3 гаммы витамина A_1 алкоголя. Этот стандарт и служит для измерения активности всех форм витамина А.

β-Каротин был оставлен в качестве стандарта лишь для измерения активности провитаминов А.

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА А

При всем разнообразии форм витамина А, присутствующих в природных источниках, все же возможно суммарное определение активности этого витамина, близко отвечающее данным биологического испытания.

Спектрофотометрический метод определения витамина А применяется главным образом для анализа высокоактивных жиров, концентратов и перемалываемых фракций малоактивных жиров. При этом коэффициенты экстинкции при 328 $m\mu$ являются надежными показателями содержания витамина А только тогда, когда в исследуемом материале нет примесей, обладающих близким спектром поглощения. С целью устранения из отсчетов дополнительного поглощения, даваемого примесями, Мортон и Штаббс [6] разработали метод внесения поправок, позволивший получать при спектрофотометрических измерениях величины, хорошо совпадающие с результатами биологических испытаний.

Простой и быстрый метод вычисления поправки Мортон и Штаббса, принятый фармакопейными комитетами ряда стран, опубликован Корр [7].

Исправленная величина абсорбции витамина А = $7A_{325m\mu} - 4,375A_{334m\mu} - 2,625A_{380m\mu}$, где А обозначает величину абсорбции витамина А при соответствующей длине волны, указанной с правой стороны.

Для упрощения расчетов эту формулу удобнее применять в следующем преобразованном виде.

Исправленная величина абсорбции = $7(A_{325m\mu} - A_{310m\mu}) + 4,375(A_{310m\mu} - A_{334m\mu})$.

Исправленная величина абсорбции = 0,498.

При внесении поправки спектрофотометрический метод дает результаты наиболее близко, по сравнению с другими методами, совпадающие с результатами биологических испытаний.

Абсорбционные кривые провитаминов D₂ и D₃ представлены на рис. 1, витаминов D₂ и D₃ — на рис. 2.

Цветной продукт реакции, образующийся при взаимодействии хлороформенного раствора треххлористой сурьмы и

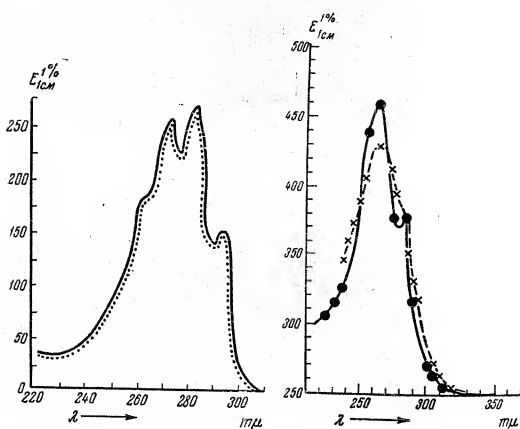


Рис. 1. Абсорбционный спектр 7-дегидрохолестерина (—) и эргостерина (.....) в этиловом спирте

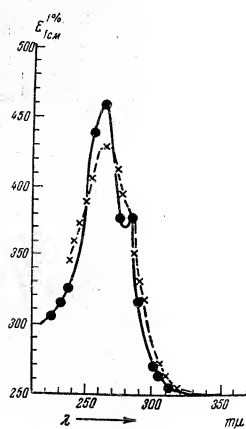


Рис. 2. Абсорбционный спектр витамина D₂ (x—x—x—x—x) и витамина D₃ (o—o—o—o—o) в гексане

раствора витаминов D₂ и D₃ в хлороформе, имеет максимум абсорбции при 500 мμ, его коэффициент экстинкции $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 1800$.

Более подробно свойства провитаминов и витаминов D₂ и D₃ суммированы в табл. 2, а их производных — в табл. 3.

Таблица 2

Свойства провитаминов и витаминов D₂ и D₃

Показатели	Эргостерин	Витамин D ₂	7-Дегидрохолестерин	Витамин D ₃
Эмпирическая формула	C ₂₈ H ₄₄ OH	C ₂₈ H ₄₄ OH	C ₂₇ H ₄₃ OH	C ₂₇ H ₄₃ OH
Молекулярный вес . . .	396,6	396,6	384,6	384,6
Температура плавления	133°	115—117°	142—143,5°	82—84°
Температура перегонки при 0,4 мм остаточного давления	250°	250°	—	—
Максимум абсорбции в мμ (в спирте)	284	281,5	281	264,5
$E_{1\text{ см}}^{1\%}$ при максимальной абсорбции	268	453,9±7,5	280	473,2±7,8
$E_{1\text{ см}}^{1\%}$ при 500 мμ продукта реакции с SbCl ₃	36	1800	36	1800
Оптическая активность [α] _D :				
в эфире	— 94,0°	+ 91,2°	—	—
в хлороформе	—125,2°	+ 52,25°	—113,6°	—
в бензоле	—125,8°	+ 87,5°	—	—
в спирте	— 93,0°	+106,2°	—	—
в ацетоне	— 92,0°	+ 83,5°	—	+83,3°
Интернациональных единиц в 1 мг	—	40 000	—	40 000
Антирахитическое действие	Нет	Очень сильное	Нет	Очень сильное
Биологическая активность	»	Млекопитающие	»	Млекопитающие
Действие дигитонина	Осаждается	Нет	Осаждается	Нет

от веса желтка количество 96%-ного этилового спирта, смесь взбалтывают и неомыляемую фракцию экстрагируют серным эфиром в 3 приема: 1-й раз — 5-кратным количеством и 2 раза — 2,5-кратным количеством по отношению к весу желтка.

В указанном примере к 22 г желтка приливают 44 мл воды, 33 мл 60%-ного раствора КОН, общий объем 99 мл. После омыления добавляют 198 мл воды и 44 мл спирта. Экстракцию витамина А производят эфиром, причем первый раз берут 110 мл эфира и 2 раза — по 55 мл.

Эфирные вытяжки соединяют, отмывают водой от щелочи, сушат в течение 30 мин. безводным Na_2SO_4 и после фильтрации эфир отгоняют под вакуумом досуха. Сухой остаток растворяют в 5–10 мл хлороформа.

Хлороформенный раствор используют для колориметрирования. Вычисляют содержание витамина А в 1 г желтка или в 1 г яйца.

Определение витамина А в сыворотке крови

10 мл сыворотки крови помещают в колбу Эрленмейера на 50–100 мл и приливают 1 мл 60%-ного раствора КОН. Колбу закрывают резиновой пробкой, снабженной воздушным холодильником (стеклянной трубкой, имеющей 60–100 см в длину с внутренним диаметром, равным 3–5 мм), и проводят гидролиз на кипящей водяной бане в течение 30 минут.

После охлаждения массу переносят в делительную воронку и приливают 5–10 мл этилового спирта. Витамин А экстрагируют эфиром (4 раза по 25 мл эфира), дальнейший анализ ведут так же, как описано при определении витамина А в молоке.

Литература

1. Robeson C. D. a. Baxter J. G. Neovitamin A.—*J. Am. Chem. Soc.*, 69, 136 (1947).
2. Ледерер Е. А. и Розонова В. А. Исследования по витамину А в рыбьих жирах 1. Ненормальная реакция Carr u. Price.—*Биохимия*, 2, 203 (1937).
3. Lederer E., Rosonova V., Gilliam A. a. Neilbron J. Differences in the chromogenic properties of freshwater and marine fish liver oils.—*Nature*, 140, 233 (1937).
4. Jensen J. L., Shantz E. M., Embree N. D., Gawley J. D. a. Harris P. L. The biological activity of vitamin A₂.—*J. Biol. chem.*, 149, 473 (1943).
5. Gilliam A. E., Heilbron J. M., Jones W. E. a. Lederer E. On the occurrence and constitution of the 693 mμ chro-

- mogen (vitamin A₂?) of fish liver oils.—*Biochem. J.*, 32, № 2, 405 (1938).
6. Morton R. A. a. Stubbs A. L. Spectrophotometric determination of vitamin A in liver oils. Correction for irrelevant absorption.—*Biochem. J.*, 42, 195 (1948).
 7. Korr Z. Rapid method of calculation Morton — Stubbs correction on determination of vitamin A.—*Chem. Analyst*, 42, № 1, 15 (1953).
 8. Murray T. K. a. Campbell J. A. A comparison of physical and chemical methods with biological assay of vitamin A.—*J. Pharmacol. a. Pharmacol.*, 5, 596–607 (1953).
 9. Лугунов Л. Л., Букин В. Н., Березин Н. Т. и Прохорова М. К. Гидролитический метод производства витаминных рыбьих жиров.—*Витаминные ресурсы рыбной промышленности*. Изд. АН СССР, Москва, 1951.

изгиб к оси абсцисс и идет почти параллельно с ней, то этим отрезком кривой пользоваться нельзя ввиду нарушения соответствия закону Ламберта — Бэра.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А

Определение витамина А в исследуемом растворе производят так же, как описано в разделе «Калибрование колориметра». Количество раствора, взятого на определение, подбирают в зависимости от концентрации витамина А в анализируемой навеске с таким расчетом, чтобы пропускание (D) укладывалось в пределах делений шкалы 20—45, что достигается при условии содержания 10—70 инт. ед. витамина А во взятой для колориметрирования пробе (0,5 мл).

Расчет содержания витамина А

Содержание витамина А рассчитывают по калибровочной кривой.

По показаниям гальванометра (D) находят соответствующие значения экстинкции (E) по таблице, прилагаемой в инструкции к пользованию колориметром, или рассчитывают по формуле $E = \lg \frac{1}{D}$. По калибровочной кривой находят соответствующее найденной экстинкции (E) содержание витамина А в интернациональных единицах. Найденное количество витамина А умножают на 2 и тем самым находят содержание витамина А в 1 мл приготовленного для колориметрирования раствора, затем находят содержание витамина во всем объеме исследуемого раствора, соответствующем содержанию витамина А во взятой навеске, и, наконец, рассчитывают его содержание в 1 г исследуемого образца.

Пример расчета. Неомыляемую часть навески жира или другого вещества, взятой в количестве 0,5 г, растворяли в 5 мл хлороформа. Для реакции с треххлористой сурьмой взято 0,5 мл этого раствора и 4,5 мл раствора треххлористой сурьмы. Найденная величина $D = 37$, а соответствующая ей величина $E = 0,2$. По калибровочной кривой для экстинкции 0,2 количество витамина А составляет 25 инт. ед.

$25 \times 2 = 50$ инт. ед. витамина А в 1 мл исследуемого раствора.

$50 \times 5 = 250$ инт. ед. витамина А во всем объеме исследуемого раствора или во взятой навеске.

$250 \times 2 = 500$ инт. ед. витамина А в 1 г анализируемого образца.

По вышеизложенному методу проводится определение содержания витамина А в концентратах, рыбьих жирах, печени и других богатых витамином А природных продуктах. При меньшем содержании витамина А применяются некоторые специальные приемы, о которых говорится ниже.

Определение витамина А в молоке

Омыление молока проводят спиртовой или водной щелочью. При омылении спиртовой щелочью к 100 мл молока приливают 50 мл свежеприготовленного водного раствора 60%-ного раствора КОН и 150 мл этилового спирта. Содержимое тщательно перемешивают и оставляют на 3 часа при комнатной температуре.

Для омыления водной щелочью к 100 мл молока приливают 10 мл 60%-ного раствора КОН, колбу наполняют углекислотой при перемешивании, затем закрывают пробкой и ставят в термостат на двое суток при температуре 25—37°. В течение процесса омыления содержимое 2—3 раза перемешивают осторожным вращением колбы. По окончании омыления приливают 20 мл этилового спирта. Для извлечения витамина А как в первом случае при омылении спиртовой щелочью, так и при омылении водной щелочью смесь экстрагируют эфиром 3 раза по 50 мл эфира каждый раз. Эфирные экстракты соединяют, отмывают водой от щелочи, для чего берут 3 раза по 40 мл воды, и сушат над безводным сернистым натрием. Из экстракта эфир отгоняют досуха и сухой остаток растворяют в 2 мл хлороформа. Полученный хлороформенный раствор употребляют для колориметрирования.

Определение витамина А в желтке яйца

Яйцо взвешивают, отделяют желток в тарированную колбу на 200 мл и определяют его вес. В колбу с желтком добавляют двойное от веса желтка количество воды и 60%-ный водный раствор КОН в соотношении 1,5 : 1 к весу желтка.

Пример. Вес желтка 22 г, требуется воды 44 и 33 мл 60%-ного раствора КОН.

Колбу соединяют с обратным холодильником и содержимое омыляют на кипящей водяной бане в течение 30 мин. при периодическом пропускании тока CO_2 .

Омыленный раствор после охлаждения помещают в делительную воронку, приливают двойной объем воды и двойное

3. Хлороформ.
4. Серный эфир.
5. Этиловый спирт.
6. Хлористый ацетил или свежеперегнанный уксусный ангидрид.
7. Бензол.
8. Маленовый ангидрид (х. ч.).
9. Дигитонин*.
10. Вазлон с CO_2 или HCl в концентрации 1 : 1 и диаметр для получения CO_2 .
11. Смазка для притертых крапов, нерастворимая в органических растворителях (крахмал в глицерине).

IV. Подготовка реактивов и приготовление растворов

1. 50%-ный раствор KOH (50 г KOH растворяют в 50 мл диэтилопропановой воды).
2. Этиловый спирт для освобождения от альдегидов оставляют на ночь над твердым химически чистым NaOH (10 г на 1 л спирта) и затем перегоняют или перегоняют без наставания. Самая тщательная очистка спирта достигается перегонкой спирта, декантированного с осадка окиси серебра, образовавшегося при встряхивании 1 л спирта с 3 г KOH и 1,5 г азотнокислого серебра.
3. Серный эфир. Продажный эфир отмывают от перекисей щелочным перманганатом калия. К 1 л эфира в делительной воронке приливают 10 мл 40%-ного раствора NaOH или KOH и 190 мл 4%-ного раствора перманганата калия. Эфир несколько раз встряхивают. После отстаивания водный раствор окисленного перманганата (зеленого цвета) сливают и эфир обрабатывают еще несколько раз, если проба указывает на присутствие перекисей. Эту пробу производят следующим образом: к 20 мл эфира приливают 5 мл смеси, состоящей из равных объемов 50%-ного раствора KI и 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина, и встряхивают. Образование красной окраски указывает на присутствие перекисей. После освобождения от перекисей эфир отмывают от щелочи водой до потери реакции с фенолфталеином, сушат обезвоженным сернистым натрием и перегоняют.

* Производится на экспериментальном заводе Харьковского научно-исследовательского химико-фармацевтического института.

4. Хлороформ для удаления HCl , образующейся при его хранении в результате гидролиза, и скарта, добавляемого обычно для стабилизации, промывают 2—3 раза водой (объем на объем), сушат безводным Na_2SO_4 , встряхивают с пятиокисью фосфора и перегоняют, отбирая фракцию при 61—62°.

5. Ацетил хлористый перегоняют при 56°, хранят в сызке темного стекла с хорошо притертой пробкой. Если пользуются уксусным ангидридом, то при перегонке отбирают фракцию в пределах 140—142°.

6. Раствор треххлористой сурьмы. На каждые 23 г SbCl_3 берут 100 мл хлороформа. Треххлористую сурьму, содержащую влагу, промывают хлороформом до прекращения образования мутного раствора гидрата окиси сурьмы. Промытый реактив сушат в вакуум-капелле над концентрированной H_2SO_4 в течение 1—2 суток и затем берут навеску для приготовления раствора.

При использовании загрязненной треххлористой сурьмой ее предварительно перед растворением перегоняют следующим образом. В реторту на 500 мл со стеклянной притертой пробкой и отводной трубкой длиной 18—20 см, с внутренним диаметром у выходного конца, равным 12 мм, помещают 60—100 г SbCl_3 и 2—3 стеклянные бусинки для равномерности кипения с целью предотвращения перегрева жидкости.

Эту операцию можно также вести в колбе Вюрца с короткой и широкой отводной трубкой. Реторту с содержимым устанавливают на электроплитке или водобатареяте и включают обогрев. При 73° треххлористая сурьма расплавляется, а при 219° жидкость закипает. Для равномерного кипения и предупреждения закупорки конца отводной трубы реторту дополнительно подогревают газовой горелкой (пламя горелки передвигают вдоль реторты непрерывно до конца перегонки). Когда на дне реторты останется немного жидкости, перегонку прекращают.

Первую фракцию отгона, представляющую собой окрашенную и желтый цвет жидкость — соляную кислоту с небольшим количеством сурьмы, отбрасывают. Чистую сурьму собирают в сухие предварительно тарированные пробирки. Пробирки временно закрывают корковыми пробками, и, по окончании перегонки, взвешивают, а затем записывают.

Реторту отмывают соляной кислотой (1 : 1).

7. Бензол для освобождения от тиофена постоянно замораживают при температуре минус 1—2°, кристаллы отфильтровывают, переносят в стеклянную банку, сушат над CaCl_2 и

Из табл. 7 и составленного на ее основе рис. 3 можно видеть, что средние отклонения результатов химического определения от биологического составляют 12,7% в сторону повышения и 12,6% в сторону занижения.

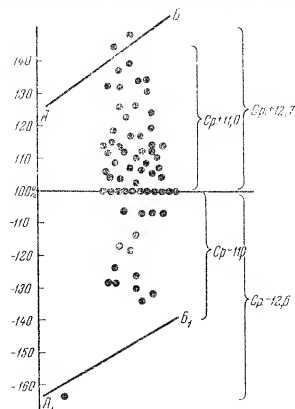


Рис. 3. Сравнение химического и биологического методов определения витамина D. Каждая точка показывает отклонение (в %) результатов испытания от биологического метода от результатов биологического результата. За 100% приняты показания биологического определения. Точки означают: выше линии 100% — данные химического метода, превышающие показания биологических испытаний; на линии 100% — совпадающие данные химического метода и биологических испытаний; ниже линии 100% — данные химического метода, занижающие показания биологических испытаний. Линии AB и A₁B₁ отсекают равнозначные отклонения химического метода от показаний биологических испытаний.

Если же отбросить далеко выходящие отклонения в трех опытах (жир дельфина, сайана и судака), то эти отклонения соответственно составят +11,5% и -11,0%.

Учитывая, что точность самого биологического определения составляет ±15%, указанное соответствие между химическим и биологическим методами определения витамина D следует признать вполне удовлетворительным.

Описание метода

Необходимая посуда, оборудование, реактивы, их подготовка и обработка

1. Посуда

(из расчета проведения двух параллельных анализов).

1. Колбы Эрленмейера на 100 мл — 4 шт., на 200 мл — 2 шт.

2. Стеклообразные трубки длиной 100 см с внутренним диаметром 3,5 мм — 2 шт. (служат в качестве воздушных холодильников при омылении жиров).

3. Колбы Вюрца или Клайзена на 100–150 мл — 1 шт.

4. Холодильник Либиха среднего размера — 1 шт.

5. Колба Вульена на 250 мл — 1 шт. (приемник к холодильнику Либиха).

6. Цилиндры мерные на 40, 25, 50 и 100 мл — по 1 шт.

7. Стаканчики химические на 30, 50, 100 мл — по 2 шт.

8. Делительные воронки на 200 мл — 2 шт.

9. Хроматографические колонки 15 см длиной с внутренним диаметром 4 см — 2 шт.

10. Колбы Вульена на 250 мл — 2 шт. (приемники к хроматографическим колонкам).

11. Пробирки — 2 шт. (для помещения в колбы Вульена в качестве приемников элюатов с хроматографических колонок).

12. Пипетки на 10, 2 и 1 мл — по 1 шт.

13. Скребок Тейшенко для промывания и сушки CO₂ — 2 шт.

14. Вакуумный эксикатор — 1 шт.

15. Склянка на 250–500 мл из темного стекла с хорошо притертой пробкой и притертым колпачком для хранения раствора треххлористой сурьмы — 1 шт.

II. Оборудование

1. Фотоэлектрический колориметр марки ФЭК-М с синезеленым светофильтром с областью пропускания 480–520 мк и максимумом пропускания при 500 мк. Можно пользоваться также визуальным колориметром Нудлриха.

2. Водяная баня.

3. Электрическая плита.

4. Термометр на 100–150°.

5. Пемза, фарфор или стеклянные бусы для равномерности кипения.

6. Секундомер или песочные часы на 4 мин.

7. Шприцы на 10 и 5 мл, к ним присоединяются шпатель для отбора растворов треххлористой сурьмы и хлороформа.

III. Реактивы

1. Витамин D₂ — кристаллический химически чистый (для калибрования электрофотоколориметра).

2. Едкое кали (х. ч.).

Таблица 7 (продолжение)

Наименование исследованных животных и концентратов	Район или место подготовки образцов	Содержание витамина D, инт. ед.		Отклонение от биологических испытаний в %
		по химическому методу	по биологическим испытаниям	
Печени трески	Мурманск	75	108	-30,56
Печени кита, гидролизованной с растительным маслом	Институт биохимии АН СССР	300	290	+ 9,0
Кита зубатого	Дальневосточный край	275	256	+ 7,42
Из батона	Мурманск	0	0	0,0
Из консервов печени лососевых	Институт биохимии АН СССР	300	250	+16,67
Из консервов печени трески	То же	405	305	+32,78
Из внутренностей сайана	Астрахань	60	45	+33,33
То же, другой образец	То же	100	88	+18,68
Судак из внутренностей	» »	80	54	+48,14
То же, другой образец	» »	250	216	+15,74
Лосось из внутренностей	» »	150	183	-18,00
То же, другой образец	» »	360	286	+25,87
Дельфин подкожный	Азово-Черноморский бассейн	0	43	0,0
То же, другой образец	То же	100	106	-7,4
Печени полирной трески	Мурманск	80	68	+17,6
То же, другой образец	То же	85	61	+39,0
Кита финналя подкожный	ВНИРО	435	397	+22
II. Облученные жиры				
Тяжелый подкожный	Азово-Черноморский бассейн	4317	3510	+10,40
Морского осетра из внутренностей	Мурманск	4533	4075	+11,24
Северный тунцовый	Волго-Каспийский бассейн	5000	4750	+ 5,26
Печени балтийской трески	Ливония Латвийской ССР	7800	7110	+ 9,72
Северный из молока	Еолго-Каспийский бассейн	4694	4075	+15,20
Молосков	Институт биохимии АН СССР	11 200	10 000	+10,71
Кита подкожный	Дальневосточный край	3 737	3 600	+ 3,80

Таблица 7 (окончание)

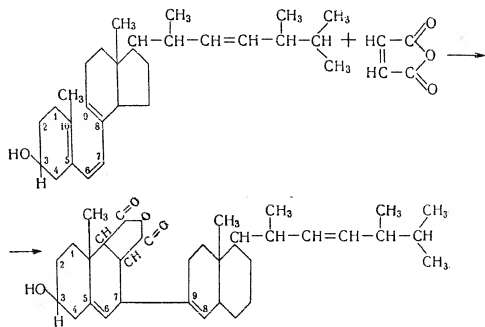
Наименование исследованных животных и концентратов	Район или место подготовки образцов	Содержание витамина D, инт. ед.		Отклонение от биологических испытаний в %
		по химическому методу	по биологическим испытаниям	
Печени акулы	Мурманск	3 300	3 100	+ 6,45
Лосось из внутренностей	Астрахань	5 680	5 500	+ 3,3
То же, другой образец	То же	3 200	3 500	- 5,7
Из отходов частичных	Мосрыбкомбинат	9 275	1 000	+ 7,25
Кита подкожный	То же	5 775	5 750	+ 0,4
Кита подкожный после гидролиза с печенью кита	» »	1 140	1 000	+14,0
Образец № 5	» »	10 120	9 000	+12,4
Образец № 8	» »	11 070	10 200	+ 8,5
Печени балтийской трески	Ливония Латвийской ССР	7 110	6 850	+ 3,8
Трески после гидролиза с печенью антарктического кита	Мосрыбкомбинат	18 000	13 000	+38,4
Трески	То же	1 650	2 000	-15,5
Кита	» »	1 140	1 000	+14,0
Технический	» »	2 500	2 000	+25,0
III. Образцы облученного эргостерина				
Спартовый концентрат витамина D ₂	Витаминный цех фабрики «Марат»	139 000	160 000	-31,4
То же	То же	160 000	200 000	+20,2
» »	» »	180 000	160 000	+12,2
» »	» »	50 000	53 000	- 5,7
» »	» »	200 000	270 000	-26,0
» »	» »	131 000	125 000	+ 5,0
» »	» »	240 000	230 000	+ 4,3
» »	» »	71 500	54 400	+31,4
» »	» »	80 000	93 200	-14,2
» »	» »	675 000	590 000	+14,4
» »	» »	70 500	54 400	+29,84
» »	» »	13 500	10 000	+25,93

количества маленового ангидрида при 40—45° в течение 20 мин. сохраняется на 98—99%.

Проверка коэнтности конденсации тахистерина в растворах облученного эргостерола показала, что при данных условиях за 20 мин. тахистерин конденсируется полностью.

Наличие метильной группы при углеродном атоме с двойной связью отличает тахистерин от витамина D₂ и обуславливает легкую подвижность его сопряженных двойных связей, благодаря чему тахистерин реагирует с маленовым ангидридом быстрее, чем витамин D и другие фотодериваты.

Присоединение маленового ангидрида к тахистерину идет по двум углеродным атомам системы сопряженных двойных связей (в положении 7, 8) с образованием новой двойной связи (в положении 5,6), а именно:



Образовавшийся продукт конденсации устойчив к окислению ввиду отсутствия сопряженных двойных связей и по этой же причине не вступает в реакцию с треххлористой сурьмой.

Так как оценка любого химического метода определения витамина D может быть дана лишь на основе сопоставления с результатами биологических испытаний, в помещенных ниже табл. 7 и рис. 3 мы приводим накопившиеся в нашей лаборатории результаты сравнительного анализа многих образцов.

Таблица 7

Сравнение химического и биологического методов определения витамина D

(Содержание витамина в 1 г жира и в 1 мл сыровых концентратов)

Наименование исследованных жиров и концентратов	Район или место изготовления образцов	Содержание витамина D, мкг. сд.		Отклоне- ние от био- логических испытаний в %
		по хи- миче- скому методу	по био- логи- ческим испы- таниям	
I. Не облученные жиры				
Тяжелая подкожный . .	Волго-Каспийский бассейн	20	0	0,0
То же	То же	0	0	0,0
Дельфина подкожный . .	Азово-Черноморский бассейн	40	103	-63,0
То же годовика	То же	25	0	0,0
Печени акулы	Дальневосточный край	75	80	-6,25
Печени акулы катран . .	Азово-Черноморский бассейн	25	0	0,0
Кита подкожный, вита- минизированный кито- вой печенью	Дальневосточный край	500	700	-28,57
Печени минтая	То же	22	0	0
Печени ската (морского юта)	Азово-Черноморский бассейн	0	0	0,0
Из внутренностей сайага	Волго-Каспийский бассейн	470	325	+44,16
Морского окуня из вну- тренностей	Мурманск	100	140	-28,57
Лена из внутренностей	Волго-Каспийский бассейн	250	325	-23,08
Северюги тулованной из срезов	Волго-Каспийский бассейн	0	0	0,0
Печени балтийской трес- ки	Лиспан Латвийской ССР	145	216	-32,87
То же, другой образец	То же	100	76	+31,60
Северюги из молок . . .	Волго-Каспийский бассейн	25	0	0,0

активности. Данные обоих методов хорошо согласуются с результатами биологических испытаний. Различие методов состоит лишь в применении разных адсорбентов и их обработке, а также в деталях проведения отдельных операций.

ПРИНЦИП МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА D И НЕКОТОРЫЕ ЕГО УТОЧНЕНИЯ

Метод основан на осаждении стернов дигитонином, удалении из раствора тахистерина путем его конденсации с малеиновым ангидридом и отделении витамина А на бентоните. В подготовленных для анализа очищенных растворах определение витамина D производят по реакции с треххлористой сурьмой в хлороформе, пользуясь в качестве стандарта для сравнения растворами чистого кристаллического кальциферола.

Описываемый метод отличается от опубликованного ранее [1] более подробным изложением отдельных операций, особенно стадии хроматографической очистки, являющейся наиболее ответственной частью анализа. Дополнительно помещены результаты проверки устойчивости витамина D₂ в процессе конденсации тахистерина с малеиновым ангидридом. Для проведения этих опытов применяли кристаллический химически чистый витамин D₂ и свежеперегнанный малеиновый ангидрид. Все операции проводили только в атмосфере CO₂.

В табл. 4 приведены данные по устойчивости витамина D₂ при конденсации в зависимости от длительности реакции при температуре конденсации, равной 40—45°, и количестве малеинового ангидрида, взятом в 7-кратном избытке по отношению к количеству витамина, исходя из молекулярных соотношений (в 1,86 раза больше против взятого количества витамина D₂).

Таблица 4

Устойчивость витамина D₂ при конденсации
в зависимости от длительности реакции

Длительность конденсации в минутах	Содержание витамина D ₂		
	Е	инт. ед.	%
Контроль (витамины D ₂ до конденсации)			100
20	0,31	6300	97,7
30	0,30	6160	97,7
40	0,28	5700	93,3
50	0,25	5150	83,3
50	0,25	5150	83,3

Как видно из табл. 4, конденсация в продолжение 30 мин. при указанных выше условиях витамина D₂ не затрагивает. В табл. 5 приведены результаты по устойчивости витамина D₂ при воздействии в течение 20 мин. при 40—45° различных количеств малеинового ангидрида.

Таблица 5

Устойчивость витамина D₂ в зависимости
от количества взятого малеинового ангидрида

Соотношение витамина D и малеинового ангидрида	Содержание витамина D ₂		
	Е	инт. ед.	%
Контроль 1:0	0,235	4800	100
1:7	0,230	4700	97,7
1:14	0,230	4700	97,7
1:28	0,230	4700	97,7

Из табл. 5 видно, что даже 28-кратный избыток малеинового ангидрида не снижает количества присутствующего витамина D₂.

В табл. 6 представлено влияние температуры на устойчивость витамина D₂ при конденсации. Было взято 7-кратное количество малеинового ангидрида при длительности реакции конденсации, равной 20 минутам.

Таблица 6

Устойчивость витамина D₂ при конденсации
в зависимости от температуры

Температура в °C	Содержание витамина D ₂		
	Е	инт. ед.	%
Контроль (витамины D ₂ до конденсации)			100
19—20	0,44	8100	97,5
40—45	0,43	7900	97,5
50—55	0,42	7700	95,4
55—60	0,42	7700	95,4

Таким образом, на основании проведенных опытов установлено, что витамин D₂ при воздействии 7—14-кратного

отгонке избытка хлороформа нельзя допускать нагревания выше 35—40°.

6. Колориметрирование. Колориметрический метод определения витамина D основан на измерении довольно стойкой желтовато-розовой окраски, образующейся при взаимодействии растворов витамина D и треххлористой сурьмы (1:6). Величина поглощения света окрашенным раствором при 500 мμ является функцией концентрации витамина D в исследуемом растворе. Для колориметрического определения витамина D требуются следующие условия:

а) Колориметр должен давать хорошую воспроизводимость результатов измерения и пропорциональность отсчетов концентраций витамина.

б) Светофильтры должны быть с достаточно узкой полосой пропускания, желательно в пределах 480—520 мμ с максимумом пропускания при 500 мμ.

в) Гальванометр должен обладать чувствительностью порядка 10^{-8} — 10^{-9} А и сравнительно коротким временем установления равновесия стрелки или зайчика (10—20 секунд).

г) Набор кювет должен быть из бесцветного стекла одинакового диаметра (точно проверенного).

д) Электроколориметр предварительно калибруют по растворам чистого витамина D₂ известной концентрации.

7. Калибрование колориметра. 10—20 мг кристаллического химически чистого витамина D₂ помещают в тарированный небольшой бюкс и высушивают в вакуум-экзикаторе над концентрированной H₂SO₄ при 40° до постоянного веса.

Затем берут навеску высушенного кристаллического витамина D₂ с таким расчетом, чтобы в 1 мл этилового спирта (предварительно перегнанного с NaOH) содержалось 4000—8000 нит. ед. витамина D, т. е. 0,1—0,2 мг.

Пример. Допустим, что навеска высушенного витамина D₂ равна 10 мг. 1 мг витамина D₂ содержит 40 000 нит. ед., 10 мг витамина D₂ содержит 400 000 нит. ед. При растворении 400 000 нит. ед. в 50 мл спирта в 1 мл спиртового раствора содержится 8000 нит. ед. витамина D₂.

Спиртовой раствор витамина хранят в холодильнике в склянке с притертой пробкой. Для составления калибровочной кривой берут в колбу бюкса pipеткой, градуированной не до конца, 1 мл указанного раствора витамина и туда же приливают 10 мл хлороформа. Смесь хлороформа со спиртом отгоняют в вакууме досуха. Сухой остаток растворяют в точном

количестве хлороформа, в данном примере в 4 мл. В 1 мл полученного хлороформенного раствора при этом содержится 2000 нит. ед. витамина D₂. К 1 мл хлороформенного раствора витамина D₂ приливают 3 капли хлористого ацетила или свежеперегнанного уксусного ангидрида. Туда же быстро pipеткой, прикрепленной к шприцу, приливают 6 мл раствора треххлористой сурьмы. По истечении 4 минут окрашенный в желтовато-розовый цвет продукт реакции колориметрируют и записывают величину экстинкции, или процент поглощения, соответствующую 2000 нит. ед. витамина D₂. Затем находят значение экстинкции для 1000, 500, 250 и 100 нит. ед. витамина.

После колориметрирования указанных растворов витамина D₂ строят калибровочную кривую, откладывая по оси ординат величины экстинкции или проценты поглощения, а по оси абсцисс соответствующие им концентрации витамина D в нит. ед.

Калибровочная кривая должна представлять собой прямую линию, так как реакция витамина D₂ с треххлористой сурьмой подчиняется закону Ламберта — Бера.

Обычно калибровочная кривая представляет прямую линию только для определенного участка, затем при большем содержании витамина она идет почти параллельно оси абсцисс. При расчетах результатов колориметрирования следует пользоваться только тем участком калибровочной кривой, который строго отвечает закону Ламберта — Бера.

На рис. 4 представлена типичная калибровочная кривая, полученная при работе с колориметром ФЭК М.

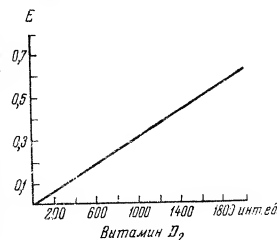


Рис. 4. Калибровочная кривая для кристаллического витамина D₂, растворенного в хлороформе

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Подсчет содержания витамина D в исследуемом растворе производят по калибровочной кривой. По показаниям гальванометра находят значение экстинкции исследуемого раствора

углекислотой, закрывают плотно корковой пробкой, помещают в водяную баню при температуре 40—45° и в течение 20 мин., не вынимая из бани колбы, круговым движением вращают ее с целью перемешивания реакционной смеси.

4. Осаждение стерина. По окончании конденсации бензол отгоняют при разрежении, к остатку прибавляют 10 мл этилового спирта, приливают 1 мл воды, кладут кусочек пемзы и содержимое нагревают на водяной бане до кипения. Добавление воды создает лучшие условия для осаждения стерина и одновременно устраняет избыток непрореагировавшего малеинового ангидрида. Затем приливают горячий 0,5%-ный или 1%-ный спиртовый раствор дигитонина в 10-кратном избытке от предполагаемого веса стерина. При содержании стерина до 5 мг в 1 г рыбьего жира приливают 5—10 мл раствора дигитонина, что достаточно для полного их осаждения. Фильтрат после отделения дигитонида проверяют на полноту осаждения стерина (на этой стадии удобно прервать работу до следующего дня; в этом случае раствор после добавления дигитонина, не отфильтровывая осадка, оставляют в холодильнике до следующего дня, закрыв колбу пробкой).

После 30—40-минутного или более продолжительного стояния осадок комплекса стериндигитонида отфильтровывают на микроворонке с водоструйным насосом через маленький бумажный плотный фильтр.

Осадок дигитонида тщательно промывают на фильтре горячим спиртом, затем эфиром и высушивают в течение 40—50 мин. при 100°. Легко отделяемый от бумаги дигитонид взвешивают.

Количество стерина вычисляют умножением веса дигитонида на коэффициент — для холестерина 0,2431, для эргостерина 0,2492. Коэффициент 0,2431 рассчитывают по формуле, выведенной из стереохимической реакции холестерина с дигитонином:

$$\frac{386,4}{386,4 + 1202} = 0,2431;$$

386,4 — молекулярный вес холестерина, 1202 — молекулярный вес дигитонина.

В фильтрат после осаждения стерина приливают один объем воды, и витамин D экстрагируют эфиром 4 раза порциями по 25 мл. Эфирные экстракты промывают водой 3 раза по 40 мл и сушат над безводным Na_2SO_4 . Сухой эфирный экстракт отфильтровывают в колбу Вюрца. Сернистый

натрий промывают эфиром 2 раза по 10—15 мл, эфир сливают через фильтр в ту же колбу и отгоняют с кусочком пемзы при слабом разрежении. К сухому остатку, с целью вытеснения следов влаги и спирта, прибавляют 5 мл хлороформа и отгоняют досуха. При этом следы влаги и спирта отходят вместе с хлороформом в виде азеотропной смеси. После этого остаток в колбе быстро заливают 2 мл сухого хлороформа.

5. Хроматография. Зарядка колонки. Отвешивают по 2 г сухого обработанного бентонита и безводного сернистого натрия, растирают в ступке и заливают 10 мл хлороформа. Полученную взвесь выливают в колонку, в узкой части которой помещена вата. Бентонит, приставший к внутренней поверхности колонки, смывают хлороформом. После оседания бентонита лишний хлороформ сливают наклонном колонки, оставив над бентонитом его слой высотой около 1 см. На бентонит насыпают около 0,5 г мелкого сернистого натрия и затем выливают из колбы Вюрца исследуемый раствор. Колбу ополаскивают 10 мл хлороформа, выливают его в колонку сразу же после прохождения через нее исследуемого раствора, не допуская перерыва. Бесцветный элюат собирают в колбу, а появляющийся затем элюат, окрашенный в желтый цвет, собирают отдельно в пробирку (его обычно бывает 3—4 мл). После этого колонку промывают 3 раза по 10 мл хлороформа, для ускорения промывку ведут с отсасыванием.

Полученные начальные и конечные бесцветные элюаты собирают в одну и ту же колбу. По окончании отмывки столбик бентонита выталкивают из колонки проволокой и выбрасывают. Колонку заряжают вторично таким же образом, как и первый раз. Собранный при работе с первой колонкой окрашенный элюат пропускают точно так же через вторую колонку и бесцветные элюаты сливают в ту же колбу, куда слиты элюаты от первой колонки. Окрашенный элюат также собирают отдельно в пробирку, колесик промывают хлороформом три раза по 10 мл и бентонит выбрасывают. Собранный окрашенный элюат пропускают через третью свежезаряженную колонку и его пропускают реакцией с SbCl_5 на присутствие витамина D. В случае отрицательной реакции третья колонка не обрабатывается, при положительной реакции проводят элюцию и отмывание.

Собранные бесцветные элюаты концентрируют в вакууме с кусочком пемзы при температуре не выше 35—40° до объема 5—15 мл в зависимости от предполагаемого содержания витамина D. При перегреве витамин D в хлороформном растворе окисляется с образованием желтой окраски, поэтому при

растворимость в 95%-ном спирте хорошая, при добавлении к спирту воды растворимость понижается; легко растворяется в смеси спирта с хлороформом. Кристаллизуется из 85%-ного спирта. Нерастворим в бензоле, ксилоле, серном эфире.

Регенерация растворителей. Отгон смеси спирта с хлороформом (см. пункт г) используется непосредственно для обработки новой партии паперстяшки (пункт б).

При осветлении экстракта согласно пункту и проверяют перед добавлением угля правильность соотношения количества спирта и хлороформа по удельному весу, который должен лежать в пределах 0,883—0,917. Если необходимо, к смеси добавляют недостающее количество хлороформа.

Для быстрого определения содержания дигитонина в сырье и определения его пригодности к переработке применяют следующий метод. Навеску (20 г) листьев паперстяшки, предварительно экстрагированных водой и высушенных при указанных выше условиях, заливают 10-кратным количеством спирта и оставляют на ночь. Листья отделяют от экстракта фильтрованием; фильтрат сгущают в 10 раз под вакуумом, к нему прибавляют в горячем виде 0,5%-ный спиртовый раствор эргостерина или холестерина (15 мл). Смесь нагревают до 70° и выдерживают при комнатной температуре в течение 20—30 минут. Образующийся осадок дигитонида отфильтровывают, промывают спиртом, затем серным эфиром, высушивают при 100° в течение 15—20 минут и взвешивают. Умножая полученный вес на 0,75, определяют примерное содержание дигитонина в навеске, а при умножении этого результата на 50 получают содержание дигитонина в 1 кг исходного сырья.

10. Бентонит, не набухающий в воде, для лучшей фильтруемости заливают 2 н. HCl (на 400 г бентонита требуется 1 л 2 н. HCl), доводят до кипения, охлаждают и отмывают водой от HCl декантацией. Высушивают при 120—130° и хранят в эксикаторе над безводным CaCl₂. Если пользуются бентонитом, набухающим в воде, то его промывают 2—3 раза хлороформом, 1—2 раза эфиром, высушивают в вакуумэксикаторе, затем в сушильном шкафу при 120—130°.

11. Смазка для кранов. 9 г растворимого крахмала, предварительно растертого в ступке до тонкого порошка, суспендируют в 22 г глицерина и нагревают при непрерывном помешивании стеклянной палочкой точно до 140°. После 30-минутного стояния смазку сливают (декантируют) в чистый химический стакан и ставят в холодильник для достижения густой консистенции.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА D В ОБЛУЧЕННЫХ И НЕОБЛУЧЕННЫХ ЖИРАХ РЫБ И МОРСКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

1. Омыление. Необлученные рыбьи жиры, в зависимости от содержания витамина D, берут на анализ в количестве от 1 до 10 г, но так, чтобы в навеске содержалось не менее 200 инт. ед. витамина.

Облученные рыбьи жиры, содержащие в 1 г не менее 2000 инт. ед. витамина D, берут в количестве 0,5—1 г, а жиры с содержанием от 5000 инт. ед. и выше — в количестве 0,25—0,5 г. К навеске жира до 1 г приливают 20 мл этилового спирта и 4 мл 50%-ного водного раствора КОН (х.ч.) и помещают в водяную баню при 85—90° с обратным воздушным холодильником на 45—50 минут. При навеске жира в 5—10 г количество спирта и щелочи берут в 2—3 раза больше, чем при работе с навеской жира до 1 г.

2. Экстракция. По окончании омыления, о чем судят по просветлению мыльного раствора, содержимое колбы переносят в делительную воронку, добавляют 1 объем воды (небольшое, иначе образуется стойкая эмульсия) и экстрагируют 4 раза по 25 мл серным эфиром. Эфирные экстракты соединяют, отмывают водой от щелочи 3 раза, причем каждый раз берут по 40 мл воды, и сушат над сернокислым натрием в течение 30 минут. Эфир сливают через фильтр в колбу Вюрца или Кляйзена, оставшийся сернокислый натрий промывают 2 раза эфиром, каждый раз по 10 мл; эфир сливают в ту же колбу и отгоняют при слабом разрежении. Возможные следы влаги вытесняют приливанием в колбочку (после отгонки эфира) 5—7 мл бензола и отгонкой бензола в вакууме; сухой остаток быстро заливают 10 мл бензола.

3. Конденсация тахистерина. К бензольному раствору неомыляемых веществ приливают 0,7%-ный раствор малеинового ангидрида, который берут в избытке, а именно — при ожидаемой активности до 5000 инт. ед. берут 0,5 мл, при 5000—20 000 инт. ед. — 0,8 мл и при активности 20 000—40 000 инт. ед. — 1—2 мл.

При пользовании сухим препаратом малеинового ангидрида вместо 0,5 мл 0,7%-ного его раствора берут навеску 5 мг и, соответственно, вместо 0,8 мл — 10 мг и вместо 2,0 мл — 15 мг ангидрида. Конденсацию проводят в колбе Эрленмейера (50—100 мл). После прибавления к бензольному раствору неомыляемых веществ малеинового ангидрида колбу заполняют

переселяют. Если нет условий для вымораживания, 1 л бензола встряхивают в делительной воронке с 10 мл концентрированной H_2SO_4 , промывают от кислоты раствором соды до прекращения окрашивания лакмуса в красный цвет, отмывают водой до нейтральной реакции, сушат свежепрокаленным $CaCl_2$ и перегоняют.

8. Маленовый ангидрид растворяют в сухом, очищенном от тиофена бензоле. Раствор (0,7%) не стоек (в присутствии следов влаги выпадает нерастворимый осадок маленовой кислоты), поэтому его готовят в количестве, необходимом для 2—3 дней работы. При анализе лучше пользоваться тут же взятыми навесками сухого ангидрида. Маленовый ангидрид применяют химически чистый. Можно применять реактив ч. д. а. (ОСТ № 8007/929), выпускаемый Харьковским заводом, при условии, если он не увлажнился. Маленовый ангидрид, выпускаемый этим же заводом под маркой «чистый», непригоден без очистки из-за присутствия примесей. Его очищают перегонкой в реторте, описание размеров которой приведено при описании способа очистки сурьмы. Перегонку ведут небольшими порциями с тем, чтобы применять в анализе свежерепергнанный или недолго хранившийся ангидрид. В реторту помещают 18 г маленового ангидрида и 3,25 г пятиоксида фосфора. Реторту с содержимым нагревают на электрической плитке или колбонагревателе. При 56° маленовый ангидрид плавится, а при 202° при атмосферном давлении перегоняется. Пятиокись фосфора плавится только при 536° , поэтому она находится в жидком маленовом ангидриде в виде твердых частиц. Для равномерного кипения и предупреждения закупорки отверстия конца отводной трубки реторту дополнительно подогревают газовой горелкой, как и при перегонке сурьмы (см. выше), не допуская перегрева, который обнаруживается по появлению газообразных продуктов разложения маленового ангидрида. Собирают маленовый ангидрид в небольшую широкую баночку; сразу после окончания перегонки его разрыхляют стеклянной палочкой и закрывают притертой пробкой.

9. Дигитонин — раствор в 95%-ном этиловом спирте — 1%-ный, если пользуются дигитонином из семян наперстянки производства Харьковского НИХФИ, и 0,5%-ный, если готовят препарат по нашему способу из отходов (полученных от Химфармавода) листьев наперстянки после их водной экстракции для приготовления препаратов, используемых при сердечных заболеваниях. По осаждающему действию на стерильные указанные препараты дигитонина совершенно идентичны. Ввиду того что метод получения дигитонина из семян наперстянки

не описан, приводим предложенный нами способ получения этого препарата из листьев.

а. Влажные листья отжимают и сушат при температуре не выше 30° (не на солнце).

б. Экстрагируют водой и высушенные листья заливают шестикратным количеством 95—96%-ного этилового спирта и настаивают при комнатной температуре в течение 2 дней. Экстракт сливают, листья отбрасывают.

в. К спиртовому экстракту для его осветления добавляют 10—15% по объему аэроформа и 3% активированного древесного порошкообразного угля. После 20—30-минутного перемешивания уголь сфильтровывают и отбрасывают. При сохранении в экстракте заметной зеленоватой окраски операцию осветления повторяют с 1% свежего угля.

г. Фильтрат густают под вакуумом при температуре не выше $30—35^\circ$ до появления белых хлопьев дигитонина (примерно в 10 раз) и ставят для кристаллизации в холодильник на 12 часов. Маточный раствор еще раз сгущают и также ставят для кристаллизации.

Примечание. Спирт (тем. кип. $78,4^\circ$) и хлороформ (тем. кип. $61,4^\circ$) образуют азеотропную смесь, кипящую при $55,4^\circ$, в которой по весу 7% спирта и 93% хлороформа, таким образом хлороформ отделяется в первых отгонках.

д. Осадок сурьма-дигитонина отфильтровывают и растворяют в малом количестве 85%-ного спирта, нагретого до $60—70^\circ$, и ставят на холод. Белые кристаллы дигитонина отфильтровывают, промывают небольшим спиртом, затем серным эфиром и высушивают в эксикаторе. Маточный раствор после перекристаллизации еще раз сгущают и ставят для кристаллизации.

е. Основным способом готового продукта состоит в его способности количественно осаждать стерин, что проверяется следующим образом. Г навеске (10 мг) чистого сухого холестерина или эргостерина, растворенной в 5 мл 95%-ного спирта, добавляют 20 мл 0,5%-ного спиртового раствора дигитонина (100 мг), нагретого на водяной бане в течение 5 мин., охлаждают и осадок отфильтровывают на микроворонке под вакуумом. Осадок тщательно промывают спиртом, затем эфиром и высушивают в сушильном шкафу при 100° в течение 15—20 мин. После этого осадок дигитонида взвешивают; умножая вес осадка на 0,244, получают вес исходного холестерина, а при умножении на 0,2492 — вес исходного эргостерина.

Дополнительные показатели качества готового продукта таковы: температура плавления около 230° (теория 235°),

Пример журнальной записи (продолжение)

Даты начала и окончания опыта	Исследуемое вещество, добавленное в диету	Предполагаемая активность (нит. ед. в 1 мл)	№ крысы	Вес н. в			Примеры хитовой про- сепит в единицах шкалы озонификации	Среднее значение в единицах шкалы озонификации
				в начале опыта	через 7 дней	перед забоем		
7.VII— 22.VII	Стандарт- ный раствор витамина D	8	9	40	42	44	10	9,4
			10	41	44	48	5	
			11	38	40	43	14	
			12	39	41	44	Погиб	
			13	42	43	46	6	
			14	43	45	47	4,5	
			15	39	46	49	11	
			16	40	42	50	15,5	
То же	То же	12	17	41	43	48	5	6
			18	42	44	49	5	
			19	39	40	47	5	
			20	40	40	45	6	
			21	38	39	44	5	
			22	43	45	49	5	
			23	42	43	50	5	
			24	39	41	45	12	
То же	Раститель- ное масло	—	25	40	42	45	20	18,6
			26	42	44	46	15	
			29	41	45	49	16	
			30	39	42	47	18	
			31	43	48	50	24	
То же	Без добавок	—	27	44	44	47	10	15
			28	38	41	44	12,5	
			32	38	40	44	13	
			M-33	41	44	49	19	
			M-34	40	43	47	21	

В нашем случае при испытании дозы, соответствующей содержанию 50 нит. ед. в 1 мл или 0,8 нит. ед. в 0,016 мл, получаем на графике (см. стр. 78) соответственно 1,07 нит. ед. Следовательно, в 1 мл жира заключается из 50 нит. ед., как предполагали, а

$$0,016 \rightarrow 1,07 \quad x = 66,8 \text{ нит. ед.}$$

$$1 \rightarrow x$$

При испытании дозы, соответствующей содержанию 150 нит. ед. в 1 мл или 0,8 нит. ед. в 0,0054 мл, получаем на графике соответственно 0,43 нит. ед. Следовательно, в 1 мл жира заключается не 150 нит. ед., как предполагалось, а

$$0,0054 \rightarrow 0,43 \quad x = 80 \text{ нит. ед.}$$

$$1 \rightarrow x$$

Берем среднее арифметическое и округлим

$$\frac{80 + 66,8}{2} = 73,4 \text{ нит. ед.}$$

В 1 мл испытуемого вещества содержится 73 нит. ед. витамина D, а 80 нит. ед. при пересчете на 1 г, исходя из среднего удельного веса рыбных жиров = 0,92.

Данным методом было проведено испытание 65 различных препаратов, содержащих витамин D (см. статью Н. Н. Гаркиной и В. Н. Букина в этом сборнике).

Метод биологического определения витамина D — проба на чистку — весьма точен и прост и не требует дорогостоящих реактивов и установок.

Литература

1. В. Н. Букин и Н. Н. Крофеева. Биологический метод определения и результаты испытания рыбных жиров и других продуктов морского происхождения на витамин D. — Сб. 1. Витаминные ресурсы рыбной промышленности. Изд. АН СССР, стр. 250—265. Москва, 1951.
2. Р. С. Смит и Дж. К. Истон. Исследование получения экспериментального рахита. — Сб. 2. Витаминная теория в практике, т. III, вып. 1, 1941.
3. S. Hue G. M., Friedman L. a. Tolle C. D. An improvement in the vitamin D line test. — Analyt. Chem., 24, № 11, 1841—43, 1952.

Обработка результатов опыта

Обработку результатов опыта можно проводить по методу графической интерполяции (см. график).

На оси ординат откладывают среднее арифметическое промеров хрящевой прослойки для каждой группы крыс; на оси

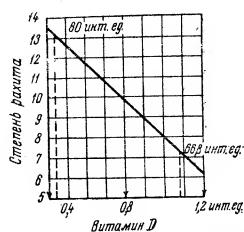


График для расчета содержания витамина D по методу графической интерполяции.

На оси ординат — степень рахита в единицах шкалы окуллярного промера; на оси абсцисс — содержание витамина D в интернациональных единицах

абсцисс — дозы стандартного раствора витамина D. Кривая для стандартного раствора изображена сплошной линией. Среднюю величину промеров для групп, получавших испытываемое вещество, откладывают на оси ординат.

Из точки пересечения со стандартной кривой опускают перпендикуляр на ось абсцисс (пунктирная линия). Точка пересечения с осью абсцисс показывает, какому количеству интернациональных единиц соответствует дневная доза испытываемого препарата. На основе этого высчитывают количество интернациональных единиц на 1 мл или на 1 г испытываемого вещества.

Приводим пример журнальной записи опыта по биологическому определению D-витаминной активности печеночного жира акулы (таблица).

Пример журнальной записи

Дата начала и окончание опыта	Исследуемое вещество, добавленное к диете	Предварительная оценка рахита (шт. ед. в 1 мл)	№ крысы	Вес в г			Промера хрящевой прослойки в единицах шкалы окуллярного промера	Среднее промеров величин шкалы окуллярного промера
				в начале опыта	через 7 дней	перед забоем		
7.VII—22.VII	Печеночный жир акулы (г. Владивосток)	150	33	38	43	45	15	13
			34	40	42	44	10	
			35	41	44	52	25	
			36	40	45	50	10	
			37	42	46	59	10,5	
			38	39	42	46	10	
			39	42	45	48	13,5	
			40	39	40	46	10	
То же	То же	50	41	40	42	47	4	7
			42	38	40	43	6	
			43	41	43	47	8,5	
			44	39	41	46	14	
			45	42	44	47	12	
			46	42	45	48	5	
			47	40	42	45	4,5	
			48	41	44	48	5	
То же	Стандартный раствор витамина D	4	1	43	43	48	20	13,4
			2	42	45	46	9	
			3	39	42	44	15	
			4	40	43	45	5	
			5	41	44	48	15	
			6	40	41	47	15,5	
			7	39	40	46	18	
			8	38	41	47	10	

Группа отрицательного контроля имеет две подгруппы. Животные одной из них не получают никаких добавок к рахитогенной диете. Животные второй подгруппы получают рафинированное подсолнечное масло в количестве 0,1 мл или 0,05 мл (в зависимости от избранного количества, даваемого всем животным), являющееся растворителем для испытуемых образцов и стандартного раствора. Три группы положительного контроля получают соответственно 0,4; 0,8 и 1,2 шт. ед. витамина D в день в виде кристаллического кальциферола, растворенного в подсолнечном масле. Две опытные группы (а если позволяет количество животных, то три группы) получают испытуемый образец, разбавленный подсолнечным маслом, соответственно предполагаемой активности, но так, чтобы одно разведение было выше, а другое ниже активности, указанной на этикетке пробы. Флаконы с разведенными препаратами и стандартными растворами следует хранить в темном, прохладном месте.

В состав двух групп отрицательного контроля входит по 5 животных, в состав остальных групп — по 10 животных. Крысы получают добавки к диете (кальциферол или испытуемые вещества) *per os* из специально проградуированной пипетки (на 0,05 или 0,1 мл) с резиновой грушей на конце; добавки даются ежедневно.

Длительность каждого из наших опытов была равна 15 дням. Вешивание животных проводили в начале опыта, через 7 дней и перед забоем. Животные, не показавшие привеса или прибавившие более 20 г, из опыта исключались. Остальных животных убивали (серным эфиром).

Исследование состояния подопытных животных

Для исследования берут длинные берцовые кости задних конечностей. После очистки от мышц кости помещают в 4%-ный раствор формалина на 24 часа. После фиксации их хорошо промывают в воде (10—15 мин.), затем рассекают продольно тонким лезвием скальпеля. Срез кости погружают в 1%-ный раствор азотнокислого серебра и выставляют на свет яркой электролампы до появления на поверхности разреза серой окраски (соль серебра, связанная в неустойчивое соединение с фосфорнокислыми солями кальция кости, восстанавливается до металлического серебра, дающего темную окраску).

После этого срезы быстро промывают водой и помещают в 4%-ный раствор гипосульфита на 10—15 мин. для закрепления

окраски. Затем вновь промывают водой и переносят в 4%-ный раствор формалина или 75%-ный спирт. В таком виде срезы могут долго сохраняться.

На поверхности разреза кости в области зоны эпифизарного окостенения на темном фоне костной ткани выделяется светлая хрящевая полоса («черта», отсюда название метода — «проба на черту»).

Степень рахита определяют по ширине этой прослойки хряща, измеряемой с помощью окулярного микрометра под бинокулярной лупой. Нормой является ширина хрящевой прослойки, равная 300—360 микронам, большая величина свидетельствует о наличии рахита.

Если количество исследуемых животных не велико и нет необходимости сохранять опытный материал, то обработку костей можно значительно сократить. Отрегенерированную кость сразу же рассекают продольно, затем промывают в дистиллированной воде (10 мин.), погружают в раствор азотнокислого серебра и выставляют на свет электроламп до появления ясно заметной окраски. В таком виде кости немедленно просматривают (не вынимая их из раствора азотнокислого серебра) под бинокулярной лупой и производят промер ширины хрящевой прослойки.

Шу, Фридман и Толь [3] большое внимание уделяют промывке среза кости перед погружением в азотнокислое серебро. Для более четкого равномерного окрашивания они рекомендуют следующую обработку.

Срез кости помещают в отдельную для каждого животного чашечку со смесью из 3 частей эфира и 1 части ацетона на 5 минут. После этого кости просушивают и для удобства дальнейшей обработки укрепляют на пластинку, покрытую слоем резинового клея. Далее пластинку (с прикрепленными к ней срезами костей данной группы крыс) погружают в 95%-ный этиловый спирт на 10 мин., затем на 10 мин. в ацетон. После этого пластинку промывают не менее 30 мин. дистиллированной водой, сменяя ее через 1, 10 и 20 мин. После промывания пластинку погружают в 2%-ный раствор азотнокислого серебра. Для длительного сохранения срезов авторы рекомендуют тщательную промывку после обработки азотнокислым серебром и последующее высушивание кости.

Наблюдаемое иногда не вполне равномерное окрашивание среза кости объясняется тем, что жир мозгового вещества кости просачивается на поверхность среза и мешает прокрашиванию. Обработка ацетоном и эфиром предотвращает это явление.

Н. Н. ЕРОФЕЕВА

**БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
D-ВИТАМИННОЙ АКТИВНОСТИ («ПРОБА НА ЧЕРТУ»)**

Определение биологической (антирахитической) активности витамина D₂ проводят на молодых белых крысах. Удобнее всего проводить определение не лечебным, а профилактическим методом, дающим ответ уже через 2 недели опыта [1].

В основу этого метода положено определение того минимального количества испытуемого препарата, которое при ежедневном введении крысам, содержащимся на рахитогенной диете, предохраняет их в среднем на 80% от заболевания рахитом. Параллельно исследуют действие стандартного раствора кристаллического витамина D и на основании сопоставления результатов испытания делают расчет активности опытного образца, выражая ее в интернациональных единицах.

Так как опытные животные должны быть максимально однородны по возрасту, весу, условиям содержания до опыта и по содержанию и рациону маточного поголовья, необходимо при лаборатории иметь собственный питомник.

СОДЕРЖАНИЕ КРЫС В ПИТОМНИКЕ

Рацион маточного поголовья обычный, обеспечивающий полноценность диеты и хорошую плодовитость самок. Рацион состоит из круп, овса, отрубей, мяса, молока, хлеба и овощей. Во избежание накопления витамина D у молодняка из рациона исключается лишь рыбий жир.

Для большей однородности материала излишек приплода свыше 6—7 штук уничтожают; при рождении менее 5 штук приплод идет для пополнения маточного поголовья и в опыт не включается. Молодняк, достигший веса 40—50 г, поступает в опыт.

Формирование и содержание опытных групп

Обычно для опыта составляют 6—8 групп. В каждую опытную группу, по возможности, включают по одному крысенку из данного помета для того, чтобы группы были наиболее однородны. Каждого крысенка взвешивают и метят.

Метки удобно делать путем покраски раствором индигиновой кислоты, условно приняв покраску головы за № 1, спины — за № 2, у хвоста — № 4, правой передней лапы — № 32, левой передней лапы — № 8, правой задней лапы — № 64, левой задней лапы — № 16. Комбинации указанных окрасок частей тела крысенка позволяет поместить большое число животных. Например, № 6 состоит из окраски спины и около хвоста (2 + 4), № 9 — из окраски левой передней лапы и головы (8 + 1) и т. п.

Все группы переводят на рахитогенную диету следующего состава:

Пшеничная мука (30%-ного или 73%-ного помола) . . .	90 частей
Сухие пивные или пекарские дрожжи	5 »
Очищенный мел	2,9 части
Поваренная соль	2 »
Лимоннокислое железо	0,1 »

Иногда при замедленном росте добавляют зеленые проростки овса в небольшом количестве.

Составные части смешивают и из смеси выпечают лепешки. Каждый крысенок получает 20—25 г лепешек в сутки. Прокляченная вода дается в неограниченном количестве.

В некоторых лабораториях используют другую диету. Р. С. Смелянская [2] рекомендовала диету следующего состава:

	в %
Мясо сушеное	10
Сахар	15
Очищенный мел	4
Поваренная соль	1
Пшеничная мука	70

Животных каждой группы содержат в отдельных клетках в помещении без прямого солнечного света, что исключает возможность синтеза витамина D в коже подопытных животных.

Таблица 9

Обнаружение витаминов D₂ и D₃ в подвижной фазе 87%-ного метилового спирта на бумаге, пропитанной 3%-ным раствором парафина

Наименование веществ, нанесенных на бумагу	Нанесено испытания		Условия хро- матографиро- вания		Продвижение по фронту в см		R _f	Длина пятна в см
	в мл	фрт	Т°	продвиже- ние в часах	фазы	палла		
Витамин D ₂ (свидетель)	0,005	20	24	16	При стека-	24	0,44	5
Масляный раствор витамина D ₂	0,002	20	24	16	нии раство- рителя	25	0,46	4
Витамин D ₃ (свидетель)	0,05	20	24	16	длина ли- нии фронта	47,5	0,88	5
Жир кита	0,08	20	24	16	54	43	0,80	5
» трески	0,06	20	24	16		44	0,81	4

Следует подчеркнуть, что для витаминов D₂ и D₃ величины R_f могут изменяться в зависимости от природы растворителей, качества бумаги, ее пропитывания и других условий, по всегда имеется возможность, применяя свидетели, эти условия использовать таким образом, чтобы достигнуть разделения витаминов D₂ и D₃.

ВЫВОДЫ

Проведены исследования по изысканию методов хроматографического разделения на бумаге провитаминов и витаминов D, при этом установлено следующее:

1. Провитамины и витамины D весьма близки по своему поведению при хроматографическом разделении на бумаге; этим следует объяснить крайне недостаточное количество работ по их разделению этим методом.
2. Путем подбора должного сорта отечественной бумаги (например, бумага № 2 Ленинградской бумажной фабрики), соответствующей ее обработки (промывание, пропитывание) и применения определенных растворителей (диоксан, метиловый и этиловый спирты) удалось доказать возможность;

а) разделения провитаминов D (эргостерина, 7-дегидро-холестерина в присутствии холестерина);

б) разделения витаминов D₂ и D₃;

в) количественного определения витаминов D₂ и D₃ после их разделения на бумаге.

3. Метод бумажной хроматографии на бумаге провитаминов и витаминов D открывает возможность его применения в широкой области исследований, касающихся характера их биосинтеза, а также их превращений в процессах обмена в норме и патологии и в целом ряде исследований в области стероидов.

В заключение считаю своим долгом принести благодарность проф. В. Н. Букину за ценные советы и указания при выполнении данной работы и проф. В. И. Вендгу за предоставление синтетического препарата 7-дегидрохолестерина и препарата витамина D₂.

Литература

1. Zaffaroni A., Burton R. B. a. Keutmann E. N. The application of paper partition chromatography to steroid analysis.— Journ. of biol. chem., 177, 109 (1949).
2. Mc Mahon J. M., Davis R. B. a. Kalnitsky G. Identification of sterols in filler paper and their separation by paper partition chromatography.—Proceedings of the Soc. for exp. biology a. medicine, 75, 799 (1950).
3. Нейман М. В., Левковский В. И. а. Луковников А. Ф. Хроматографическое разделение дигитрофенилгидранов на ацетилованной бумаге. — ДАН, 81, № 5, 841 (1951).
4. Гаркина И. И. и Букин В. И. Химический метод определения витамина D в рыбных жирах. — Витамины: ресурсы и их использование. Сб. 1. Изд. АН СССР, 1951.

количественного определения такая бумага не пригодна, так как при экстракции стерина извлекается и касторовое масло, которое мешает реакции с SbCl_3 .

IV. Разделение витаминов D_2 и D_3

Разделения витаминов D_2 и D_3 можно достигнуть только в тщательно очищенных экстрактах, свободных от стерина и витамина А. В указанных ниже подвижных фазах витамин D_2 во всех случаях продвигается по бумаге дальше по фронту, чем витамин D_3 , с разницей в величине R_f в 72%-ном метиловом спирте на 36%, в 72%-ном диоксана на 48% и в 78%-ном метиловом спирте на 50% (табл. 7, 8 и 9).

Таблица 7

Обнаружение витамина D_3 в жире печени кита и трески

Наименование вещества, нанесенных на бумагу	Нанесено вещества		Условия хроматографирования		Продвижение по фронту в см		R_f	Длина пятна в см
	в мл	в мг	T°	время в часах	фазы	путь		
Витамин D_2 (свидетель)	0,005	20	32	16	При стекании	14,5	0,27	4,5
Витамин D_3 (свидетель)	0,05	20	32	16	растворился	41	0,76	10
Жир кита	0,08	20	32	16	на линии фронта	40	0,75	8
» трески	0,06	20	32	16	53,5	45	0,84	11

В табл. 7 приведены результаты испытания жира кита и трески. Жиры были проанализированы химическим методом и была уже известна величина содержания в них витамина D. Во всех случаях на бумагу наносили по 20 мг этого витамина. Бумага была пропитана 3%-ным раствором парафина. В качестве подвижной фазы служил 72%-ный метиловый спирт при нисходящем способе.

Из табл. 7 ясно видно, что величины R_f для обоих жиров очень близки к величине R_f свидетеля — витамина D_3 , а не свидетеля — витамина D_2 .

В табл. 8 представлены результаты испытания тех же жиров и концентрата витамина D_2 в масле при использовании в качестве подвижного раствора 72%-ного диоксана и для пропитывания бумаги — 3%-ного раствора вазелина.

Таблица 8

Обнаружение витаминов D_2 и D_3 в жире печени кита и трески и в масляном концентрате витамина D_2

Наименование вещества, нанесенных на бумагу	Нанесено вещества		Условия хроматографирования		Продвижение по фронту в см		R_f	Длина пятна в см
	в мл	в мг	T°	время в часах	фазы	путь		
Витамин D_2 (свидетель)	0,005	20	25	19	При стекании	22	0,42	2,5
Масляный концентрат витамина D_2	0,002	20	25	19	Писходящий	22,5	0,43	2
Витамин D_3 (свидетель)	0,05	20	25	19	При стекании	45	0,86	5
Жир кита	0,08	20	25	19	длина пятна фронта 52	43	0,82	4,5
» трески	0,06	20	25	19		44	0,84	6

Из табл. 8 видно, что и в данном случае в китовом и тресковом жирах обнаружен витамин D_3 , а не D_2 . Что касается масляного концентрата витамина D_2 , в нем именно этот витамин и обнаружен.

В следующей серии опытов (табл. 9) были применены 87%-ный метиловый спирт также при нисходящем способе и бумага, пропитанная 3%-ным раствором парафина. Объектами исследования служили те же жиры, что и в предыдущем опыте.

Из табл. 9 видно, что R_f так же сильно различается для витаминов D_2 и D_3 , как и в предыдущих опытах, и таким образом возможно использование комбинаций для раздельного определения наличия витаминов D_2 и D_3 в исследуемых объектах.

сравнительную яркость пятен, рассчитывают содержание витамина D в исследуемых пятнах, а затем во всем объеме экстрактов.

Таблица 5

Определение витамина D в облученных рыбьих жирах нисходящим способом в 87%-ном метиловом спирте на бумаге, пропитанной 5%-ным раствором парафина

Наименование вещества, нанесенного на бумагу	Маневро-испытания в мл	Условия хро-матоперфорации		Продвижение по фронту в см		В _г	Длина пятна в см	Сравнительная яркость пятен (в условных единицах)	Среднее содержание витамина D в 1 г жира, нг/г
		Т°	Продвижение в часах	Форм	Пятна				
Контроль (вита-мин D ₂)	0,005	26	19	50	42	0,84	3	1	400
Экстракт жира трески	0,06	26	19	50	48,5	0,97	3	0,5	200
Экстракт жира кита	0,08	26	19	50	48,0	0,96	9	0,5	200
Экстракт синтетического витами-на D ₃	0,037	26	19	50	46,5	0,93	4,5	Не-много, более 1	450

Отсюда можно вычислить и содержание витамина D в 1 г жира. Пример расчета приведен в табл. 6.

Наилучшее разделение пятен происходит в подвижной фазе, состоящей из 72%-ного или 78%-ного водного раствора диоксана. С этим растворителем витамин D можно определять даже в присутствии витамина A и родственных ему веществ, если они находятся в небольших количествах, так как эти соединения движутся по бумаге значительно быстрее, чем витамин D.

б) Определение витамина D путем колориметрирования экстракта из пятен. Для количественного определения витамина D колориметрированием экстракта из пятна на бумагу наносят по две одинаковые пробы исследуемого раствора.

Таблица 6

Расчет содержания витамина D в анализируемых образцах

Наименование образца	Всего экстракта, мл	Всего экстракта, мл	Содержание витами-на D в пятне, нг/г	Найдене витамина D в пятне, нг/г	Взвот жира, г	Найдене витамина D в 1 г жира, нг/г
Контроль (вита-мин D ₂)	—	0,005	400	—	—	—
Экстракт жира трески	1,5	0,06	200	5000	5	1000
» » кита	1,5	0,08	200	3750	5	750
Синтетический витамин D ₃	1,5	0,037	450	18 000	1	18 000

После хроматографирования бумагу разрезают по всей длине листа на 2 равные полосы (4 см шириной каждая). На одной из полос бумаги проявлением падают место нахождения пятна. По пайденному пятну отмечают положение пятна на непроявленной полоске и вырезают его с некоторым запасом по длине к верхнему и к нижнему концу. Вырезают такой же величины полоску бумаги без нанесенных растворов для контроля (бумага пропитана парафином или вазелином). Оба отрезка бумаги (опытный и контрольный) разрезают на мелкие кусочки, помещают в две пробирки и экстрагируют нагретым до 40° метиловым или этиловым спиртами (4 раза порциями по 20 мл) в течение 5 мин. на водяной бане при 40°. После охлаждения экстрагированный с бумаги парафин выпадает в осадок, его отфильтровывают. Спирт отгоняют в вакууме, сухой остаток растворяют в 1—1,5 мл хлороформа и хлороформный раствор колориметрируют после развития окраски в реакции с SbCl₃. При расчете величины экстинкции для контрольной бумаги вычитают из величины экстинкции для бумаги с пятном и далее ведут расчет содержания витамина D с учетом объема экстракта и величины взятой навески.

Примечание. Хотя при употреблении бумаги, пропитанной касторовым маслом, удается хорошо разделить стерны с образованием небольших четких пятен, но она пригодна только для качественного определения стернов. Для

Таблица 4

Хроматографирование высокоактивных образцов витамина D без отделения стерина нисходящим способом на бумаге, пропитанной 2%-ным раствором касторового масла

Наименование веществ, нанесенных на бумагу или предполагаемых	Нанесено вещества		Условия хроматографирования				Продвижение по фронту в см		R _f	Длина пятна в см
	в мл	в мг	T	температура, °C	влажность, %	подвижная фаза	фазы	пятна		
Смесь	0,025	100	22	22		87%-ный метиловый спирт	—		—	—
Внесены:							—		—	—
эргостерин	0,005	20	—	—	—		0	0	0,8	
холестерин	0,01	40	—	—	—		0	0	0,6	
7-дегидрохолестерин	0,005	20	—	—	—		10,5	0,21	4,5	
витамины D ₂	0,005	20	—	—	—		18	0,36	6,0	
Спиртовой концентрат витамина D ₂ (144 000 инт. ед. в 1 мл)	0,014	—	22	22			—		—	—
Проверен на присутствие:							—		—	—
эргостерина	—	—	—	—	—		0	0	0,5	
холестерина	—	—	—	—	—		Нет	—	—	—
7-дегидрохолестерина	—	—	—	—	—		18,5	0,37	4	
витамина D ₂	—	—	—	—	—		Нет	—	—	—
Экстракт синтетического витамина D ₃	0,05	—	22	22		При стекании растворителя длина линии фронта 50	—		—	—
Проверен на присутствие:							—		—	—
эргостерина	—	—	—	—	—		0	0	0	
холестерина	—	—	—	—	—		7,2	0,12	1,5	
7-дегидрохолестерина	—	—	—	—	—		12	0,24	4,2	

определения витамина D в двух высокоактивных образцах, полученные при использовании свидетелей, составленных из смеси стерина и витамина D₂.

В точке 1 нанесен свидетель, составленный из смеси стерина (табл. 4), в точке 2 — спиртовой концентрат витамина D₂, в точке 3 — концентрат синтетического витамина D₃.

Из хроматограммы видно, что эргостерин и холестерин из смеси свидетелей как и надо было ожидать, остаются неподвижно в точке нанесения (1), тогда как 7-дегидрохолестерин и еще более витамин D₂ продвинулись по фронту растворителя.

В спиртовом концентрате витамина D₂ неподвижным остается эргостерин, в то время как витамином D₂ продвигается так, как и в смеси свидетелей. Наконец, при разделении концентрата синтетического витамина D₃ неподвижное пятно по своей окраске указывает на наличие холестерина, в то время как 7-дегидрохолестерин и в еще более значительной степени витамин D₃ продвинулись по бумаге вперед.

Следует отметить, что по бумаге, пропитанной парафином или вазелином, витамин D₃ идет впереди витамина D₂, а при пропитывании ее касторовым маслом их расположение является обратным.

III. Количественное определение витамина D

Количественное определение витамина D проводили двумя способами:

а) Сравнением величины и интенсивности окраски пятен, образованных исследуемым раствором и свидетелем.

б) Колориметрированием окраски, даваемой экстрактом из определяемого пятна при взаимодействии с SbCl₅.

а) Определение витамина D по окраске пятен. Величины, получаемые методом сравнения пятен, хотя и являются субъективными, но они близки к данным колориметрирования экстракта из пятен. Метод сравнения окраски пятен удобно применять при проведении серийных анализов животных тканей и при других массовых анализах. Очистку экстрактов из облученных жиров для нанесения их на бумагу проводят, как описано в методе химического определения витамина D [4]. В экстрактах необлученных жиров и тканей животных стерин отделяют вымораживанием, а витамин А — хроматографией на колошке с бентонитом [4]. В табл. 5 представлены данные определения витамина D в рыбьих жирах по методу сравнения пятен.

Зная точное содержание витамина D в контрольном пятне, объем исследуемых экстрактов, нанесенных на бумагу, и

количества метилового спирта, кристаллы стерина растворяют в небольшом количестве бензола и наносят на бумагу.

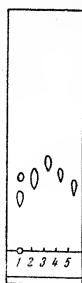


Рис. 4. Определение витамина D в экстрактах омыленных рыбьих жиров (Уменьшено в 5 раз)

Нисходящая, подвижная фаза — 87%-ный метиловый спирт. Бумага пропитана 2%-ным раствором хлороформного масла в хлороформе. Продолжительность хроматографирования 22 час. при 23°. Подробные объяснения в табл. 3 и в тексте

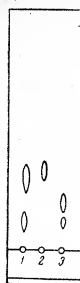


Рис. 5. Хроматографирование высокоактивных образцов витамина D без отделения стерина (Уменьшено в 5 раз)

Нисходящая, подвижная фаза — 87%-ный метиловый спирт. Бумага пропитана 5%-ным раствором парафина в хлороформе. Продолжительность хроматографирования 22 часа при 23°. Подробные объяснения в табл. 4 и в тексте

Характеристика ходы определения витамина D после отделения стерина показана в табл. 3 и на хроматограмме (рис. 4). Нанесенные пробы:

1 — нанесен свидетель, составленный из смеси стерина (табл. 3); 2 — концентрат синтетического витамина D₃; 3 — облученный жир трески; 4 — облученный жир, партия 19; 5 — облученный жир, партия 20.

На хроматограмме видно, что из смеси свидетелей эргостерин и холестерин остаются неподвижно в точке нанесения, а 7-дегидрохолестерин и витамин D₂ продвинулись вперед по фронту растворителя. В исследуемых 4 пробах витамин D продвинулся вперед. Незначительное различие R_f витамина D₂ и D₃, а также витаминов жиров, объясняется тем, что вытяжки

Таблица 3

Определение витамина D в экстрактах омыленных рыбьих жиров на бумаге, пропитанной 3%-ным раствором парафина

Наименование веществ, нанесенных на бумагу	Нанесено вещества		Условия хроматографирования		Продвижение по фронту в см		R _f	Длина пятна в см
	и мл	в г	Т°	время в часах	подвижная фаза	фазы	пигмента	
Смесь	0,025	100	22	22	87%-ный метиловый спирт	—	—	—
эргостерин	—	20	—	—	—	0	0	0,5
холестерин	—	40	—	—	—	0	0	0,5
7-дегидрохолестерин	—	20	—	—	—	12,5	0,25	3
витамина D ₂	—	20	—	—	—	16,5	0,31	1,5
Экстракты из: синтетического витамина D ₃	0,05	—	22	—	—	17,5	0,35	4
облученного жира трески	0,05	—	22	22	—	19,5	0,39	2
облученного жира (партия 19)	0,01	—	22	22	—	17,5	0,35	2
облученного жира (партия 20)	0,05	—	22	22	—	15	0,30	3
					При стекании растворителя, длина зоны фронта 50 см			

Примечание. Пятна, образованные витамином D, при проявлении все окрашивались одинаково в лимонный цвет.

* Синтетический витамин D₃ растворен в тресковом жире.

из указанных образцов, после отделения стерина, не подвергались хроматографической очистке (см. раздел IV).

Высокоактивные образцы витамина D (спиртовые и масляные концентраты, содержащие в 1 мл 10 000 нит. ед. витамина и выше), а также содержащие небольшое количество стерина (до двух мг), можно хроматографировать без отделения последних. В табл. 4 и хроматограмме (рис. 5) показаны результаты

5 Витамины ресурсы

(Х), которая конденсируется с NH_2 пиримидинового кольца, образуя трехкольцевую конфигурацию. Структура тioxрома представлено на рис. 1.

Тioxром, в противоположность тиамину, хорошо растворим в высокомолекулярных спиртах и изоэспиртах, обладает янтен-

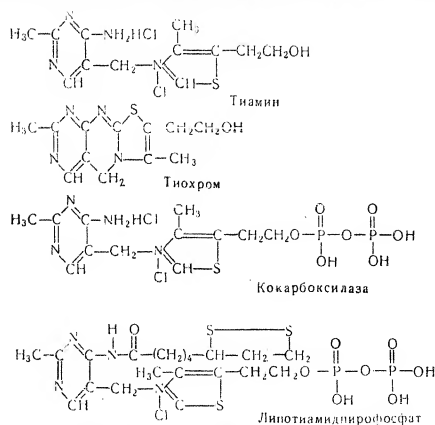


Рис. 1. Формулы тiamина и его производных

свойством флуоресценции, и это его свойство было использовано Иисеном в 1936 г. для химического определения тiamина [1].

Было предложено много модификаций тioxромного метода, из которых следует указать на метод Н. К. Мурри [2], широко применяющийся в ряде лабораторий. Недостатком как порционного метода Иисена, так и метода Мурри является отсутствие стадии адсорбции тiamина, необходимой для получения чистых вытяжек, что приводит к получению запяженного соединения тiamина в исследуемых образцах, на чем мы подробнее остановимся ниже.

Под влиянием фосфатаз от молекулы кокарбоксилазы отщепляются остатки фосфорной кислоты и кокарбоксилаза переходит в свободный тiamин. Таким образом, определение тiamина с применением ферментативного гидролиза и без него дает возможность определить свободный и связанный тiamин. Отщепление кокарбоксилазы от бенка осуществляют кислотным гидролизом.

В основе разработанного нами метода лежит метод Генсена [3].

Прежде чем перейти к описанию метода, мы приведем данные по определению тiamина в различных образцах с применением адсорбции тiamина и без нее (табл. 1).

Из приведенной таблицы видно, что почти во всех случаях (кроме ишеницы и сердцевины картофеля) найденное содержание тiamина значительно выше при применении адсорбции.

При этом, чем больше в образцах пигментов (кожура картофеля, ржаной сухарь), тем больше разница между результатами этих двух способов определения. Объяснение этого следует видеть в очень высоких показателях неокисленных вытяжек, не подвергнутых адсорбции. Окисление вытяжки, видимо, приводит к удалению целого ряда посторонних флуоресцирующих веществ, в то время как в контрольных пробах (неокисленные вытяжки) наличие этих соединений приводит к повышению показателя флуоресценции. За счет этого разницы между окисленной и неокисленной пробой уменьшается и тем в большей степени, чем больше посторонних флуоресцирующих веществ присутствует в вытяжке.

Ниже приводим описание применяемого нами метода.

Необходимые реактивы

1) Стандартный раствор тiamина: 10 мг тiamинхлорида растворяют в 100 мл 0,01 н. HCl . Сохраняется на холоду без порчи в течение длительного времени. Для приготовления



Рис. 2. Колонка для адсорбции тiamина В

Предлагаемый профилактический метод является физиологически более правильным в том отношении, что у животных не развивается глубоких авитаминозов, отход животных поэтому отсутствует, а продолжительность испытания сокращается в два раза.

Литература

1. Bacharach A. L., Coates M. E. a. Middleton T. R. Biological test for vitamin P activity — *Biochem. J.*, 36, 407, 1942.
2. Rusznayk S. a. Benko A. Experimental vitamin P deficiency. — *Science*, 34, 25, 1931.
3. Majovsky G. J., Lesser A. J., Lawson H. C., Carne H. O., Thienes C. H. Vascular fragility and permeabilities influenced by various agents. — *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 80, 1—7, 1944.
4. Курсанов А. Л., Букки В. Н., Поволоцкая К. Л. и Запроматов М. Н. Биологическое действие чайного танина. — *Биохимия*, 15, № 4, 1950.
5. Селезенева А. А. Исследование функциональной способности сосудистой системы. — Сб. «Витамины в теории и практике», № 2, т. II, вып. II, 1941.
6. Lavy H. a. J. Prolongation des effets de l'adrenaline sur l'intestin isolé de cobaye, en présence de substances polyphénoliques naturelles dérivées de la flavone (phényl-benzo-γ-pyrone). — *Compt. rend. soc. biol.*, 135, 1193—1197, 1941.
7. Исаченко В. Б. Влияние аскорбиновой кислоты и рутина на действие адреналина. — *Бюлл. эксп. биол. и мед.*, № 4, 1953.
8. Gabb M. et Parrot J. Action de la vitamine C₂ (P) sur la structure de la glande thyroïde. — *J. de physiol.*, 40, 63, 1948.
9. Дурминидзе С. В. и Букки В. Н. Физиологические свойства дубильных и красящих веществ винограда. — *ДАН СССР*, 76, 703, 1951.
10. Курсанов А. Л., Запроматов М. Н. и Ерофеева Н. Н. Витаминная активность катехинов чайного листа. — *Биохимия*, 17, № 6, 1952.
11. Дурминидзе С. В., Букки В. Н. и Ерофеева Н. Н. Биологическое испытание разных типов виш. — *ДАН*, 88, № 1, 1953.
12. Букки В. Н. и Ерофеева Н. Н. Сравнительная Р-витаминная активность катехинов чая, дубильных веществ винограда и рутина грецких. — *ДАН СССР*, 98, № 6, 1954.

В. Н. БУККИ, К. Л. ПОВОЛОЦКАЯ,
А. А. КОНДРАШОВА и Е. П. СКОРОБОГАТОВА

ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ТИАМИНА

Тиамин встречается в природе как в свободном состоянии, так и в виде двух коферментов. Пирофосфорный эфир тиамин является простетической группой фермента карбоксиплазы, осуществляющего неокислительное descarboxилирование пировиноградной кислоты с образованием CO₂ и ацетальдегида или ацетона (ацетилметилкарбинола). Помимо того, кокарбоксилаза при соединении с так называемой «липонной» кислотой образует липотиамиид-пирофосфат, являющийся активной группой фермента, осуществляющего окислительное descarboxилирование пировиноградной кислоты с образованием CO₂ и использованием полученного ацетала путем переноса через кофермент А для всех реакций ацетилирования, которые известны для пантотеновой кислоты, например для образования липонной кислоты из щавелево-уксусной.

Тиамин является соединением пиримидинового и тиазолового колец через четвертичный азот. Его строение и строение его производных представлено на рис. 1.

Тиамин (свободный и гидрохлорид) представляет собой белое кристаллическое вещество с точкой плавления 249—250°. Максимум поглощения его раствора лежит в области 245—247 мμ. Тиамин хорошо растворим в воде, разведенных кислотах, в водоспиртовых смесях, в чистом этиловом спирте его растворимость меньше. Нерастворим в хлороформе, эфире, бензоле, бутаноле и изобутанолом. Тиамин устойчив к повышенной температуре в кислой среде, но разрушается при нагревании в нейтральной и щелочной средах.

Под влиянием окислителей тиамин превращается в тиокром, при этом группа СН тиазольного кольца превращается в группу

Таблица 2

Животные контрольной группы
Опыт № 70

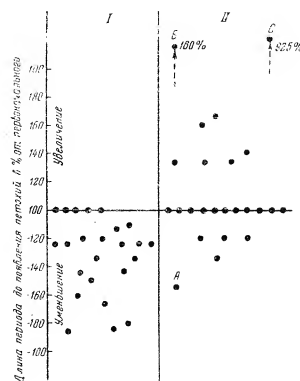
Метки (№ крысы)	Вес в г		Дневной привес в г	Период до появления петехий и сеп.		% удлинения периода до появления петехий
	7.VIII	7.IX		7.VIII	7.IX	
25	85	100	0,5	20	20	0
26	87	110	0,7	40	30	-25
27	90	100	0,3	25	25	0
28	93	112	0,6	15	15	0
29	76	87	0,3	35	5	-85
30	82	99	0,5	45	25	-45
31	95	128	1,1	20	10	-50
32	92	114	0,7	30	20	-34
33	85	115	1	25	20	-20
34	88	116	0,9	30	10	-67
35	95	124	0,9	10	10	0
36	98	118	0,6	35	30	-15
37	72	85	0,4	20	15	-25
38	94	110	0,5	55	10	-82
39	77	82	0,1	80	70	-13
40	78	95	0,6	20	15	-25
41	82	88	0,2	20	20	0
42	75	92	0,5	25	5	-80
43	71	82	0,3	60	35	-42
44	76	105	0,9	50	40	-20
45	75	84	0,3	95	60	-37
46	73	97	0,8	20	15	-25
47	78	100	0,7	25	10	-60
48	94	120	0,9	20	15	-25

Среднее арифметическое дневных привесов опытной группы равно 0,8 (без учета привеса крыс № 10 и 20; № 10 — дава очень большой привес, крыса № 20 — больная).

Среднее арифметическое удлинения периода до появления петехий для данной группы (без учета показателя для крыс № 4 и 22, давших большой прирост, и для крысы № 6 — больной) равно +8,6%.

Среднее арифметическое дневных привесов контрольной группы равно +0,6 г. Среднее арифметическое удлинения периода до появления петехий у животных контрольной группы равно минус 32% (см. рисунок). На рисунке представлены данные измерения периода до появления петехий для каждого животного опытной и контрольной групп.

Из приведенных журнальных выписок видно, что чайный танин, в ежедневной дозе 2 мг на крысу, не только не вызывает уменьшения периода до появления петехий, но увеличивает его и, следовательно, укрепляет стенки капилляров, и то время как в контрольной группе период до появления петехий уменьшается на 32%. Привесы животных контрольной группы несколько ниже привесов животных опытной группы.



Влияние чайного танина на длительность периода до появления петехий.

Черными точками обозначена длительность периода до появления петехий для каждого животного контрольной группы. I — у животных контрольной группы; II — у животных опытной группы. Буквами А, В, С отмечены точки, резко отклонившиеся от других и не принимающиеся в расчет при вычислениях.

Аналогичными опытами удалось установить относительную эффективность разных дозировок и фракций чайного танина [10], сравнительную Р-витаминную активность танина винограда и виноградных вин [11], рутина из листьев гречи [12] и других источников витамина Р.

смеси). Ежедневно в кашу подмешивают иодированный казеин (25 мг на каждое животное в день).

Иодированный казеин вводился для усиления обмена веществ и скорейшего истощения запасов изучаемого витамина в организме. Этот прием за последние годы получил широкое распространение при витаминологических исследованиях и оправдал себя.

На такой диете животных содержат в течение 30 дней. Животные отрицательного контроля никаких добавок к вышеупомянутому рациону не получают. Животные опытных групп ежедневно получают те или иные добавки испытуемых веществ через рот. Скамливание производят из специальной толсто-стенной пипетки с резиновой грушей на конце.

Через 30 дней, в конце опыта, животных взвешивают и у них вновь определяют период до появления нетахий. Определение проводят спустя 3 часа после последнего кормления испытуемым веществом.

Способ получения иодированного казеина

20 г казеина помещают в 700 мл дистиллированной воды, содержащей 5 г NaHCO_3 , и растворяют при помешивании, смесь помещают в водяную баню с температурой 38—40°.

3,7 г тонкого порошка иода добавляют маленькими порциями в течение 3—4 часов. Раствор непрерывно тщательно перемешивают механической мешалкой. После добавления требуемого количества иода раствор оставляют при температуре 70° при тщательном помешивании на 18—20 часов. После диализа иодированный казеин осаждают при изотонической точке, высушивают и размельчают в мелкий порошок.

Вычисление результатов опыта

При вычислении результатов опыта первый отсчет времени появления нетахий для каждого животного принимают за 100%. Животные, показатели которых резко отклоняются от показателей основной массы животных данной группы, в обработку не берутся.

Р-активным веществом считается такое, которое при скамливании животным в течение 30 дней поддерживает сохранение первоначального периода до появления нетахий или приводит к повышению его у 80% животных данной группы (в каждой

группе должно быть не менее 20 животных). Средние дневные привесы групп животных, получавших Р-активное вещество, должны быть выше, чем у животных контрольной группы, не получавших добавок. Основным показателем Р-витаминной активности вещества является увеличение периода до появления точечных кровоизлияний.

Приводим пример журнальной записи одного из опытов по испытанию препарата Р-витаминной активности чайного танина (табл. 1 и 2).

Таблица 1

Группа животных, получающих чайный танин

Опыт № 70. Испытуемое вещество — чайный танин *

Дневная доза 2 мг

Мышь (№ крысы)	Вес в г		Дневной привес в г	Период до появления нетахий в сек.		% увеличения периода до появления нетахий
	7.VIII	7.IX		7.VIII	7.IX	
1	85	125	4,3	15	15	0
2	95	116	0,7	25	25	0
3	95	120	0,8	15	20	+ 33
4	85	96	0,4	35	360	+925
5	92	130	1,2	20	20	0
6	95	118	0,7	75	30	- 54**
7	99	140	1,3	15	15	0
8	88	100	0,4	25	40	+ 60
9	86	121	1,1	20	20	0
10	93	141	1,6	15	15	0
11	90	125	1,1	60	60	0
12	71	93	0,7	15	25	+ 66
13	87	118	1	25	20	- 20
14	82	108	0,5	40	40	0
15	75	110	1	15	20	+ 33
16	83	108	0,8	30	20	- 34
17	94	105	0,3	80	80	0
18	73	109	1,2	15	20	+ 33
19	92	98	0,2	20	20	0
20	71	64	-0,2	25	20	- 20
21	85	91	0,2	40	40	0
22	80	115	1,1	25	65	+160
23	87	111	0,8	25	35	+ 40
24	87	115	0,9	50	40	- 20

* Препарат чайного танина был получен в лаборатории А. Л. Кур-сатова.

** Большая крыса.

щитовидную железу, авторы и приняли в качестве показателя Р-витаминной активности привеса подопытных животных. Для более яркого проявления действия щитовидной железы в диету животных вводили йодированный казеин. Животные, получавшие йодированный казеин плюс витамин Р, давали больший привес по сравнению с контрольными животными, получавшими йодированный казеин без витамина Р.

На способности витамина Р усиливать накопление аскорбиновой кислоты в тканях [9] основан дополнительный показатель его действия, сводящийся к определению количества аскорбиновой кислоты в почках, надпочечниках, селезенке и печени морских свинок. Вводимая опытным и контрольным животным аскорбиновая кислота накапливается в значительно больших количествах в той группе, которая получала витамин Р.

Ранее мы использовали лечебный метод питания Р-витаминных веществ. Опыт длился 2 месяца; первый месяц представлял собой предварительный или истощающий период, во время которого все животные получали диету без добавок испытываемого вещества. В течение второго месяца на той же диете продолжали оставаться животные группы отрицательного контроля, животные же опытных групп получали добавку исследуемых веществ. У всех животных отмечали длительность периода до появления петехий и определяли вес тела перед началом опыта, в конце истощающего периода и в конце опыта. Позже мы отказались от проведения предварительного истощающего периода и начинали скармливание животным испытываемых веществ с первого дня перевода на опытный рацион.

В предлагаемой нами в данной работе методике имеются 2 показателя действия витамина Р — укрепление резистентности кровеносных капилляров и привес животных.

В этой модификации методика применялась нами лишь в профилактических опытах; ее описание дается ниже.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ Р-ВИТАМИННОЙ АКТИВНОСТИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Формирование опытных групп

Опыт проводится на белых крысах весом 70—95 г. В опыт должны поступать молодые животные из одного питомника, находившиеся в равных условиях выращивания и содержания. Желательно проводить опыт на крысах одного пола (лучше

на самцах) или составлять смешанные группы таким образом, чтобы в них было равное число самцов и самок. Содержать самцов и самок необходимо в отдельных клетках.

Ход опыта, диета

Отобранных для опыта животных метят и взвешивают. Для каждого животного отмечают длительность периода до появления петехий в секундах при отрицательном давлении — на 200 мм ртутного столба ниже атмосферного. Определение периода до появления петехий проводят путем наложения вакуумных присосок на брюшко животного, предварительно остриженное и смазанное вазелином для лучшего контакта с стеклянной воронкой (присоской), имеющей диаметр, равный 1 см. Выщипывание или бритье волос вызывает раздражение кожи, а иногда и местные кровоизлияния и вследствие этого применяться не может.

При определении периода до появления петехий животное лучше не привязывать, а спокойно держать в руках, чтобы не вызывать побочного фактора раздражения, что несколько изменяет показатель периода появления петехий. Необходимо регистрировать петехии на одних и тех же участках тела животного, так как скорость их появления на разных участках тела различна. Кровоизлияния видны через стеклянную присоску простым глазом, для лучшей видимости можно пользоваться лупой.

При появлении двух отчетливо видных кровоизлияний останавливают секундомер, присоску снимают и через лупу вторично проверяют наличие кровоизлияний на данном участке кожи.

После взвешивания и установления длительности периода до появления петехий животных переводят на диету следующего состава:

	в %
Соевый шрот	51,3
Кукуруза молотая	46,3
CaCO ₃	0,6
CaHPO ₄	0,9
NaCl	0,44
MgSO ₄ · 4H ₂ O	0,04

Кукурузу варят, затем к остывшей каше подмешивают остальные компоненты смеси. Кроме того, животные получают сухие пекарские дрожжи (10% от общего веса смеси 2 раза в неделю) и рыбий жир (3 раза в неделю по 5% от общего веса смеси).

V — показания флуорометра для стандартного раствора, содержащего 0,4 $\mu\text{г}$ в 1 мл;

0,4 — содержание рибофлавина в $\mu\text{г}$ на 1 мл стандартного раствора;

P — навеска в г;

v — общее разведение в мл.

Б. Методика определения кислотно-гидролизуемого и фосфатазно-отщепляемого рибофлавина

Для определения кислотно-гидролизуемого и фосфатазно-отщепляемого рибофлавина остается в силе метод, разработанный нами ранее совместно с Е. П. Скоробогатовой [4].

Навеску материала тщательно растирают в ступке с небольшим количеством 0,1 н. H_2SO_4 и переносят в колбу, куда добавляют 0,1 н. H_2SO_4 до общего разведения 1 : 15 или 1 : 20. Смесь выдерживают в кипящей водяной бане в течение 45 мин., охлаждают до 30°, pH вытяжки доводят до 4,5 насыщенным раствором уксуснокислого натрия. К вытяжке прибавляют ферментативный препарат кларазы или мицелия *Penicillium* для освобождения рибофлавина из нуклеотидной формы. Препарат добавляют из расчета 30 мг на 1 г сухого вещества навески. Вытяжку помещают в термостат на 12—16 часов. Затем вытяжку доводят водой до такого объема, чтобы общее разведение было равно 1 : 25 или 1 : 30, и вытяжку фильтруют. 10 мл вытяжки обрабатывают перманганатом калия и хлористым оловом с гидросульфитом натрия точно так, как это описано при определении общего количества рибофлавина. Объем вытяжки доводят до 15 мл. Измерение интенсивности флуоресценции производят так, как это описано выше. Расчет содержания рибофлавина производят по той же формуле.

Если произвести измерение флуоресценции вытяжки, подвергнутой только кислотному гидролизу без ферментативной обработки, то можно определить сумму свободной и мононуклеотидной формы рибофлавина без динуклеотидной формы.

Вариант 2-й

Общее содержание рибофлавина и его форм можно определять и по другой методике, в основе которой лежит применение трихлоруксусной кислоты.

При определении общего содержания рибофлавина (что соответствует разделу А в 1-м варианте) материал подвергают

совершению такой же обработке, как это указано в 1-м варианте, но вместо обработки материала фосфатазными препаратами применяют трихлоруксусную кислоту. Из вытяжки после 12—16-часового настаивания в термостате с протеолитическими ферментами, доведения объема до общего разведения 1 : 25 или 1 : 30 и фильтрации берут 5 мл фильтрата, добавляют 5 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты и смесь нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут. После этого вытяжку охлаждают, добавляют $\frac{1}{4}$ объема 4 М раствора K_2HPO_4 , окисляют перманганатом калия и восстанавливают хлористым оловом и гидросульфитом натрия, как это указано в 1-м варианте. Объем доводят до 15 мл и производят измерение флуоресценции.

Определение суммы кислотно-гидролизуемых форм рибофлавина (что соответствует разделу Б в 1-м варианте) производят следующим способом, в основе которого лежит метод Ловри [3]. Навеску материала растирают с определенным объемом воды, добавляют равный объем 20%-ной трихлоруксусной кислоты и вытяжку нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут, фильтруют, добавляют $\frac{1}{4}$ объема 4 М раствора K_2HPO_4 , окисляют перманганатом калия и восстанавливают хлористым оловом и гидросульфитом натрия, как указано выше.

Следует отметить, что для большинства животных тканей и для тех растительных продуктов, которые лишены пигментов, можно проводить определение без окисления перманганатом калия и восстановления хлористым оловом. Это во многом упрощает метод определения, но уже небольшое содержание пигментов заставляет применять способ окисления.

Определение флуоресценции в этом варианте следует сопровождать измерением флуоресценции рабочего раствора рибофлавина, приготовленного не на воде, а на растворе трихлоруксусной кислоты, для чего в мерную колбу на 100 мл вносят 37,5 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты, 24 мл 4 М раствора K_2HPO_4 , 1 мл стандартного раствора рибофлавина и объем доводят водой до 100 мл. Флуоресценция такого стандарта слабее на 8—10% флуоресценции стандарта, приготовленного на воде.

2-й вариант имеет перед 1-м преимущество в скорости проведения определения и получения более очищенных вытяжек. Недостатком этого способа является замедленное тушение флуоресценции гидросульфитом натрия, вследствие чего следует проводить его 2—3 раза, для этого в кюветы повторно вносят гидросульфит натрия и снова измеряют флуоресценцию.

так как содержание рибофлавина в препаратах не превосходит указанной величины.

Все указанные ферменты могут быть использованы в качестве протеслитических ферментов, в качестве же фосфатазных препаратов следует использовать лишь кларазу и препарат из мицелия.

Помимо вышеуказанных реактивов следует иметь раствор 20%-ной трихлоруксусной кислоты и 4 М раствор K_2HPO_4 , которые необходимы в тех случаях, когда определения производят по 2-му варианту, о чем будет сказано ниже.

Необходимые приборы

1. Флуорометр, снабженный чувствительным гальванометром, двумя специфичными светофильтрами с максимумами пропускания около 430 мμ (первый светофильтр) и 525 мμ (второй светофильтр) и пробирками или кюветами для измерения растворов.

2. Механическая качалка, желательна с круговым качанием, на 12—16 гнезд.

В а р и а н т 1-й

А. Методика определения суммарного содержания рибофлавина (общий рибофлавин)

Навеску материала тщательно растирают в ступке с небольшим количеством фосфатного буфера (рН 7,8—8,0). Растертую массу переносят в колбу с добавлением того же буферного раствора, так, чтобы общее разведение было около 1 : 15 или 1 : 20, смесь выдерживают в кипящей водяной бане в течение 45 мин., охлаждают до 30°, проверяют значение рН и, в случае сдвига в кислую зону, что часто наблюдается при работе с кислыми объектами, снова доводят величину рН до 7,8—8,0, после чего к смеси добавляют ферментный препарат (трипсин или кларазу—30 мг на 1 г сухого вещества). Смесь помещают в термостат при 37° на 12—16 час. При этом от белка отщелачивается прочно связанная с ним форма рибофлавина. Затем рН смеси доводят до 4,5, прибавляя 0,1 н. H_2SO_4 , вносят препарат фосфатазы (клараза или высушенный мицелий *Penicillium*) и снова ставят в термостат при 37° на 12—16 час. для расщепления нуклеотидных форм рибофлавина. После этого объем вытяжки

доводят до общего разведения 1 : 25 или 1 : 30 и вытяжку фильтруют через складчатый фильтр.

10 мл фильтрата окисляют раствором перманганата калия, для чего к вытяжке прибавляют по каплям 4%-ный раствор $KMnO_4$ до тех пор, пока красноватая окраска не перестанет исчезать. Обычно добавленное количество не превышает 0,2—0,5 мл. Вытяжку оставляют на 10 мин. для окисления посторонних флуоресцирующих веществ или веществ, маскирующих флуоресценцию рибофлавина. Через 10 мин. прибавляют по каплям 3%-ный раствор H_2O_2 до исчезновения окраски перманганата калия. Затем к вытяжке прибавляют 0,2 мл рабочего раствора $SnCl_2$ и 0,1 мл 2,5%-ного раствора гидросульфита натрия для восстановления посторонних флуоресцирующих веществ, при этом сам рибофлавин переходит в лейкоформу.

Вытяжку энергично встряхивают в течение 20 мин. для того, чтобы обратимо-восстановленный рибофлавин перешел в окисленную флуоресцирующую форму. После проведения окисления и восстановления объем вытяжки доводят до 15 мл и, если вытяжка мутная, то ее фильтруют. После этого производят измерение интенсивности флуоресценции посредством флуорометра.

Флуориметрия. Вытяжку и стандартный рабочий раствор рибофлавина помещают в две одинаковые пробирки или кюветы и измеряют интенсивность их флуоресценции посредством флуорометра по шкале гальванометра. В обе пробирки прибавляют на кончике шпателя $NaHCO_3$ и $Na_2S_2O_4$ (примерно по 0,1 г) для тушения флуоресценции рибофлавина и снова производят измерение интенсивности флуоресценции. При этом в стандартном растворе флуоресценция рибофлавина тушится до нуля. В исследуемых вытяжках остается небольшая флуоресценция, обусловливаемая посторонними флуоресцирующими веществами, которые сохраняются в вытяжках, несмотря на обработку перманганатом калия и хлористым оловом с гидросульфитом натрия.

Расчет содержания рибофлавина производят по формуле:

$$\frac{(A-B) \cdot 0,4 \cdot x}{BP} = \mu\text{г рибофлавина в 1 г вещества,}$$

где A — показания флуорометра для испытуемого раствора (1-й отсчет);

B — показания флуорометра для испытуемого раствора после тушения (2-й отсчет);

Таблица 1
Содержание рибофлавина в образцах при их различной обработке
(в мг на 1 г)

Предварительная обработка	Ферментная обработка	Формы рибофлавина	Содержание рибофлавина			
			в горохе (соевая)	в пиве (соевая)	в горохе (соевая)	в пиве (соевая)
0,1 н. H_2SO_4	—	Свободный и мононуклеотид	1,66	0,66	0,26	0,70
То же	Фосфатаза, pH 4,5	Свободный, моно- и динуклеотиды	2,33	1,20	0,34	1,57
10%-ная трихлоруксусная кислота	—	То же	2,38	1,20	0,32	1,47
Фосфатный буфер pH 7,8	Фосфатаза, pH 4,5	» »	2,48	1,30	0,40	1,67
То же	Трипсин, pH 7,8	» »	3,50	2,10	0,64	1,95
» »	Фосфатаза, pH 4,5	Все 4 формы	3,70	2,40	0,64	1,98
» »	Трипсин, pH 7,8	То же	3,70	2,40	0,64	1,98
» »	10%-ная трихлоруксусная кислота	То же	3,70	2,40	0,64	1,98

Это достигается действием фосфатазных препаратов или трихлоруксусной кислоты после воздействия протеолитических ферментов. Из приведенных данных видно, что в последнем случае во всех исследуемых объектах определяется значительно больше рибофлавина, чем определялось в первом случае.

Ниже приведено описание разработанного нами метода определения общего содержания рибофлавина и его различных форм.

МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ РИБОФЛАВИНА И ЕГО РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ

Наша работа была направлена на разработку метода определения общего содержания рибофлавина, учитывающего и недавно обнаруженную его форму. Разработана следующая методика, позволяющая определять общее содержание рибофлавина и отдельно его различные формы.

Необходимые реактивы

1. Стандартный раствор рибофлавина: навеску рибофлавина (10 мг) растворяют в мерной колбе на 250 мл (в 1 мл такого раствора содержится 40 мкг рибофлавина). Раствор соек в течение месяца при хранении в темноте на холоду. Непосредственно перед определением каждый раз приготавливают рабочий раствор следующим образом: в мерную колбу на 100 мл вносят 1 мл стандартного раствора и доводят водой до метки.

2. 0,1 н. раствор серной кислоты.

3. Фосфатный буфер pH 7,8—8,0: приготавливают M/15 раствор $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, т. е. 11,876 г в 1 л, и M/15 раствор KH_2PO_4 , т. е. 9,078 г в 1 л. На 95 частей первого раствора берут 5 частей второго раствора. pH буферной смеси проверяют по универсальному индикатору.

4. 2,5 М раствор уксуснокислого натрия: растворяют 340 г CH_3COONa в 1 л воды.

5. 4%-ный раствор $KMnO_4$. Раствор приготавливают каждые 2 недели.

6. 3%-ный раствор H_2O_2 .

7. Раствор хлористого олова: основной раствор готовят растворением 10 г $SnCl_2$ в 25 мл концентрированной соляной кислоты. Раствор хранят в темной склянке с притертой пробкой при комнатной температуре. Рабочий раствор приготавливают каждый раз перед определением, разбавляя водой 0,2 мл основного раствора до 100 мл.

8. Раствор гидросульфата натрия: 0,25 г $Na_2S_2O_4 \cdot 2H_2O$ растворяют в 10 мл 2%-ного раствора двууглекислого натрия. Раствор приготавливают перед употреблением.

9. Ферментные препараты: трипсин, панкреатин, клараза или ферментный препарат из мицелия *Penicillium*. Мицелий, отжатый от лишней влаги лабораторным прессом до содержания 25—30% сухих веществ, высушивают при температуре не выше 45°, мелко растирают и хранят в сухом и темном месте. При внесении в вытяжку следует ферментный препарат растереть в ступке с небольшими количествами буфера или раствора уксуснокислого натрия (в зависимости от того, какую форму рибофлавина надо определить). Рекомендуется определить содержание рибофлавина в ферментных препаратах, и если оно превосходит 5 мкг на 1 г, вычесть из общего обнаруженного количества рибофлавина то его количество, которое внесено с ферментным препаратом. Обычно этого не приходится делать.

8. Витаминные ресурсы

Рибофлавин входит в состав простетической группы целого ряда окислительно-восстановительных ферментов, при этом в «старом желтом ферменте» и в оксидазе L-аминокислот рибофлавин присутствует в виде мононуклеотида, а в диафореде, ксантиноксидазе и оксидазе D-аминокислот — в виде флави-адениндинуклеотида.

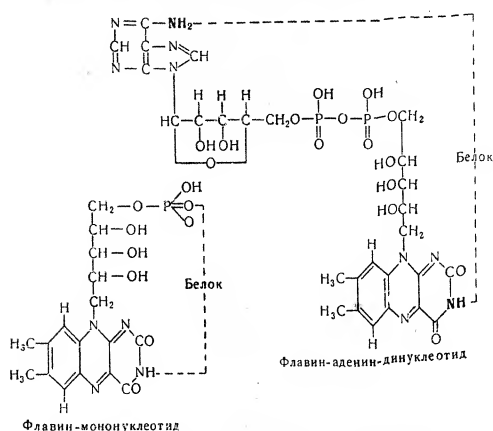


Рис. 3. Строение нуклеотидных форм рибофлавина

аденин-динуклеотида. Какие ферментативные функции выполняет вновь обнаруженная форма рибофлавина, в настоящее время неизвестно.

Современные методы определения рибофлавина основаны на его способности к флуоресценции. При этом следует учесть, что рибофлавин и его мононуклеотид обладают одинаковой флуоресценцией, флави-аденин-динуклеотид обладает лишь 10–15% флуоресценции свободного рибофлавина [3], а связанные с белком формы не флуоресцируют.

Для освобождения рибофлавина из его динуклеотида и для разрыва связи с белком применяют кислотный гидролиз и

обработку ферментными препаратами, обладающими фосфатазным действием. Для этой цели можно применять и трихлоруксусную кислоту [3]. Для освобождения вновь обнаруженной формы рибофлавина наилучшие результаты были нами получены при гидролизе материала в слабощелочных условиях и обработке его протеолитическими ферментами типа трипсина. При этом

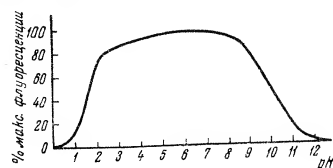


Рис. 4. Кривая флуоресценции рибофлавина в зависимости от pH.

На оси ординат — максимум флуоресценции в %; на оси абсцисс — величина pH

освобождающуюся форму рибофлавина (видимо динуклеотид) необходимо для отщепления от нее свободного рибофлавина подвергнуть вторичной ферментной обработке фосфатазными препаратами или гидролизу трихлоруксусной кислотой.

Интенсивность флуоресценции рибофлавина в сильной мере зависит от pH растворов, падающей как в сильнокислой зоне, так и в щелочной (рис. 4); поэтому перед измерением флуоресценции следует pH растворов всегда доводить до 5–6.

В табл. 1 приведено содержание рибофлавина в разных образцах при их различных обработках.

Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что при гидролизе 0,1 н. H_2SO_4 без обработки ферментом определяется значительно меньше рибофлавина, чем в случае применения обработки ферментными препаратами. При обработке трихлоруксусной кислотой ферментный гидролиз не требуется.

Если материал подвергнуть кислотному гидролизу, затем действию фосфатаз, а после этого добавить трипсин, то флуоресценция не повышается, так как в этих условиях отщепляется флави-динуклеотид, который для развития полной флуоресценции должен еще подвергнуться расщеплению фосфатазами.


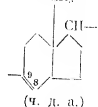
Утверждено к печати
институтом биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Редактор издательства А. А. Виттель
Технический редактор Е. В. Максим

РИСО АН СССР № 93—53В. Слано в набор 21/IV 1955 г.
Подписано к печати 24/VIII 1955 г. Формат бум. 60×92¹/₁₆.
Печ. л. 12,25 Уч.-изд. л. 11,9. Тираж 3600.
Т—06894. Издат. № 958. Типогр. зак. 1285.
Цена 8 р. 30 к.

Издательство Академии наук СССР,
Москва, Б-64, Подсосенский пер., д. 21
2-я типография Издательства АН СССР
Москва, Шубинский пер., 19

ОПЕЧАТКИ

Страница	Строка	Напечатано	Должно быть
24	4 сл.	Лугунов СН ₂	Лугунов СН ₃
30	в формуле	 (и. л. а.)	 (ч. л. а.)
185	12 сл.		

Витаминные ресурсы и их использование Сб. 3
Методы определения витаминов

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
И. Н. Гаркина. Химический и спектроскопический методы определения витамина А	5
И. Н. Гаркина и В. Н. Букин. Химический метод определения витамина Д	22
И. Н. Гаркина. Хроматографический метод разделения про-витаминов и витаминов Д	53
И. Н. Ерофеева. Биологический метод определения Д-витаминовой активности («проба на черту»)	71
И. Н. Ерофеева. Биологический метод определения Р-витаминовой активности	82
В. Н. Букин, К. Л. Поволоцкая, А. А. Кондрашова и Е. П. Скоробогатов. Флуорометрический метод определения тиамина	91
А. А. Дмитриевский. Использование кэтиопита СДВ-3 при флуорометрическом методе определения витамина В ₁	100
К. Л. Поволоцкая, Н. И. Зайцева и Е. П. Скоробогатов. Флуорометрический метод определения рибофлавина	168
К. Л. Поволоцкая, Е. П. Скоробогатов и Н. И. Зайцева. Микробиологический метод определения рибофлавина	121
К. Л. Поволоцкая и Н. И. Зайцева. Хроматографический метод разделения рибофлавина и его нуклеотидов	129
О. В. Пушкинская и Л. С. Куцева. Микробиологический метод определения пикотиновой кислоты (витамина РР)	133
Н. А. Помощникова. Микробиологический метод определения шридоксина (витамина В ₆)	145
Н. А. Помощникова. Микробиологический метод определения пантотеновой кислоты	152

Н. А. Андреева. Флуорометрический метод определения фолиевой кислоты	158
О. В. Пушкинская и Л. С. Куцева. Микробиологический метод определения фолиевой кислоты	166
Л. С. Куцева. Микробиологический метод определения витамина В ₁₂	175
В. Н. Букин, А. И. Арешкина и Е. П. Скоробогатов. Химический метод определения витамина В ₁₂	182
Приложение.	
Химический метод определения аскорбиновой кислоты (витамина С)	187
Химический метод определения каротина (провитамина А)	189

точных анализах обезжиривание рекомендуется проводить спиртом или ацетоном. Затем материал заливают бензином (летние фракции) или петролейным эфиром, перемешивают и переносят на адсорбционную колонку, наполненную воздушно-сухой окисью магния или окисью алюминия. Бензин добавляют небольшими порциями до тех пор, пока выходящий из колонки раствор не станет совершенно бесцветным. Раствор бензина просасывают через адсорбционную колонку, установленную через пробку в колбу Пушмана, посредством водного или ручного масляного насоса. При этом каротин не задерживается на колонке, проходит через нее, а хлорофилл, ксантофилл и другие пигменты ею адсорбируются.

Бензиновые вытяжки переносят в мерную колбу или мерный цилиндр с притертой пробкой, доводят бензином до определенного объема и производят колориметрирование.

В качестве стандарта может быть использован 0,036%-ный раствор $K_2Cr_2O_7$, при этом 1 мл такого раствора соответствует 0,00208 мг β -каротина*.

Расчет производят по следующей формуле:

а) при определении посредством фотоэлектроколориметра:

$$\frac{a \cdot v \cdot 100}{p} = \dots \text{ мг\% каротина,}$$

где:

a — показание фотоэлектроколориметра, переведенное по шкале в количество каротина в 1 мл раствора в мг;

p — навеска материала в г;

v — объем бензиновой вытяжки в мл;

100 — пересчет на 100 г, для получения результатов, выраженных в мг% каротина.

б) При определении на обычном колориметре:

$$\frac{h \cdot 0,00208 \cdot p \cdot 100}{h_1 p} = \dots \text{ мг\% каротина,}$$

где:

h — показания колориметра для стандартного раствора (обычно 10 мм);

h_1 — показания колориметра для исследуемого раствора;

0,00208 — коэффициент для пересчета результатов в мг каротина;

p — навеска в г;

v — объем бензиновой вытяжки в мл;

* β -каротин является международным стандартом. В качестве стандарта вместо $K_2Cr_2O_7$ может быть также использован азобензол.

100 — пересчет на 100 г, для получения данных, выраженных в мг% каротина.

При определении каротина в моркови нет необходимости бензиновые вытяжки пропускать через колонку с адсорбентом, их колориметрирование можно проводить сразу, так как в моркови почти исключительно содержится каротин без примесей посторонних пигментов.

Литература

1. Мурри Н. К. Быстрый метод количественного определения каротина. Биохимия, 2, № 6, 1937. Новый метод извлечения каротина из сырого зеленого растительного материала. — Доклады ВАСХНИЛ, вып. 4, 1943.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Б. Л. ПОВОЛОЦКАЯ, Н. И. ЗАЙЦЕВА
и Е. П. СКОРОВОГАТОВАФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
РИБОФЛАВИНА

Рибофлавин (6,7-диметил-9-d-рибтил-изоаллоксазин) — кристаллическое вещество с температурой плавления 292° , его молекулярный вес 344. Растворы рибофлавина обладают желтой окраской и желто-зеленой флуоресценцией. Рибофлавин растворим в воде, в метиловом, этиловом, бутиловом и амилловом спиртах. В эфире, бензоле и хлороформе он нерастворим.

Рибофлавин очень чувствителен к свету. Освещение его растворов при щелочных значениях pH приводит к отщеплению от его молекулы боковой цепи, содержащей 4 углеродных атома, и образованию люмифлавина, вещества, обладающего, так же как и рибофлавин, желтой окраской и желто-зеленой флуоресценцией, но, в противоположность рибофлавицу, растворимого в хлороформе. На способности люмифлавина растворяться в хлороформе были основаны первые методы его определения [1].

При освещении рибофлавина в кислотных или нейтральных растворах от его молекулы отщепляется вся боковая цепь, при этом происходит перемещение водородного атома, изоаллоксазин превращается в аллоксазин и образуется вещество, называемое люмихромом (6,7-диметил-аллоксазин). Люмихром представляет собой бесцветное вещество, обладающее голубой флуоресценцией. Строение рибофлавина, люмифлавина и люмихрома представлено на рис. 1.

Рибофлавин обладает характерной кривой абсорбции с тремя максимумами при 270, 370 и 450 $m\mu$ (рис. 2). Ярко выражены у рибофлавина окислительно-восстановительные свойства. Он легко восстанавливается гидросульфитом натрия, а также другими восстановителями, и превращается с присоединением

Флуориметрический метод определения рибофлавина

109

двух водородных атомов в лейкофлавин. При этом исчезают окраска и флуоресценция рибофлавина. Встряхивание растворов лейкофлавина на воздухе переводит его вновь в окисленное

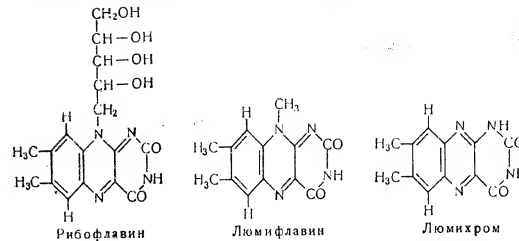


Рис. 1. Строение рибофлавина и продуктов его фотолиза

соединение — рибофлавин, с восстановлением окраски и флуоресценции.

В настоящее время известно четыре формы, в которых рибофлавин присутствует в природных источниках: свободный рибофлавин, флавин-моноклеотид, флавин-аденин-динуклеотид и недавно обнаруженная форма, существование которой было установлено К. Л. Поволоцкой [2]. Последнее вещество является, видимо, также флавин-аденин-динуклеотидом, но соединено оно с белком не через фосфорную кислоту, а, вероятно, пептидными связями. Строение нуклеотидных форм рибофлавина представлено на рис. 3, при этом в формуле флавин-аденин-динуклеотида выделены 2 группы (амидная и имидная), через которые, возможно, осуществляется связь вновь открытого соединения с белком.

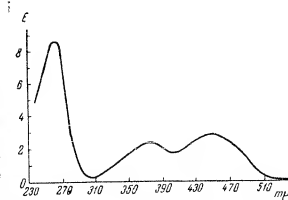


Рис. 2. Спектр абсорбции рибофлавина

ВЫВОДЫ

1. В целях более широкого использования флуориметрического метода определения витамина В₁ исследованы различные способы отделения мешающих примесей и найдено, что вместо дефицитного адсорбента декальсо с успехом можно пользоваться катионитом СДВ-3.

2. При разработке метода определения витамина В₁ с использованием катионита СДВ-3 установлены способ активирования и регенерации катионита, степень измельчения и высота столбика для адсорбции, объем и температура элюирующей смеси.

3. Показано, что катионит СДВ-3 обладает примерно в 8 раз большей сорбционной динамической емкостью, чем адсорбент декальсо.

4. Сравнительное определение витамина В₁ в 14 объектах с катионитом СДВ-3 и в декальсо, а также определение добавленного к объектам исследования витамина показали хорошее совпадение результатов.

Литература

1. Методы определения витаминов. Вессоузи. н.-и. витам. ин-т, Пищепромиздат, М., 1951.
2. Methods of vitamin assay. Ed. The association of vitamin chemists. New-York, 1951.
3. Cerecedo L. R. a. Hennessy D. J. The use of synthetic zeolites in the isolation of vitamin B₁.— J. Am. chem. soc., 59, № 9, 1617, 1937.
4. Hennessy D. J. a. Cerecedo L. R. The determination of free and phosphorylated thiamin by a modified thiochrome assay.— J. Am. chem. soc., 61, № 9, 179, 1939.
5. Астафьев В. П. Технология пермутитового водоумягчителя.— Труды Ин-та прикладной минералогии, 1953.
6. Герасимов И. И. Количественное определение витамина В₁ тиохромным методом в моче, крови и ликворе.— Биохимия, 6, вып. 2, 140, 1941.
7. Егисеева Г. Д. Флуориметрическое определение тиамина, конкарбоксылазы и рибофлавина в биологических объектах.— Витамины. I. Методы исследования, естественные ресурсы и биохимия витаминов. Ин-т биохимии АН УССР. Изд. АН УССР. Киев, 1953, стр. 38—58.
8. Труфанов А. В. и Кирсанова В. А. Одновременное получение кристаллического рибофлавина, очищенного концентрата тиамина и эргостерина из пекарских дрожжей.— Биохимия, 9, вып. 3, 239, 1944.
9. Бунин В. И., Новолонская К. Л., Кондрашова А. А. и Скоробогатова Е. П. Флуориметрический метод определения тиамина. См. настоящий сборник, стр. 91.
10. Арешидзе Х. И. и Таворткиладзе Е. К. Исследование грузинских бентонитовых глин как дегидрирующих контактов. Сообщение 1.— Журн. прикл. химии, 18, № 4—5, 274, 1945.
11. Вечер А. С. и Крайнский О. Б. Адсорбционно-фотометрический способ определения тиамина (витамина В₁).— Биохимия, 18, вып. 6, 743, 1953.
12. Шерман О. С. Тиохромный метод Янисена для определения содержания в моче витамина В₁.— Врачебное дело, 7, 631, 1948.
13. Гельд П. А. и Григоров О. Н. Пермутитовые свойства синилкагеля. Сб. Хибинские апатиты и нефелины. 1932.
14. Herr D. S. Synthetic ion exchange resins in the separation, recovery and concentration of thiamin.— Ind. a. eng. chem. (Indust. ed.), 37, № 7, 631, 1945.

шом содержании примесей в исследуемом объекте, что видно из табл. 3.

Таблица 3

Сравнительное определение витамина В₁ различными методами

Наименование объекта	Содержание витамина В ₁ в $\mu\text{г}$ на 1 г объекта естественной влажности			$\Pi \pm 1,00$
	без адсорбента	с декальсо (I)	с катионитом СДВ-3 (II)	
Пшеница (зерно)	—	3,22	3,14	-2,5
Мука пшеничная (72%-ного выхода)	1,61	3,14	3,20	+2
Гречневая каша	—	7,00	7,00	0
Горох (семена)	—	9,71	9,66	-0,5
Фасоль (семена)	5,36	8,5	8,5	0
» (листья)	1,31	1,31	1,31	0
Картофель (сердцевина клубни)	0,78	0,71	0,72	+1
» (кожура клубни)	—	0,52	0,51	-2
Печень говяжья	0,47	0,56	0,56	0
» кита	—	3,09	3,09	0
Молоко коровье	0,170	0,180	0,178	-1
Сухари ржаные	0,131	2,43	2,43	0
Моча человека	0	0,79	0,79	0
Дрожжи пекарские прессованные	—	9,02	9,02	0

Из табл. 3 видно не только хорошее совпадение результатов, получаемых во всех случаях для декальсо и катионита СДВ-3, но и возможность определения витамина В₁ в ряде объектов (листья фасоли, картофель, молоко) без адсорбентов. Само собою разумеется, что контрольные анализы необходимы всякий раз при решении вопроса о допустимости упрощенного анализа.

Убедившись в пригодности катионита СДВ-3 для замены декальсо, мы дополнительно определили содержание витамина В₁, присутствовавшего в объектах исследования, а также добавленного к 5%-ным вытяжкам из материала (2 $\mu\text{г}$ на 15 мл, что составляло 2,66 $\mu\text{г}$ на 1 г материала). Полученные результаты помещены в табл. 4.

Из табл. 4 видно, что добавленный к объектам исследования витамин В₁ был обнаружен в количестве 97—103%.

Таблица 4

Определение витамина В₁, присутствовавшего в объектах исследования и добавленного к ним, по методу с катионитом СДВ-3

Наименование объекта	Содержание витамина В ₁ , до и после добавления его в количестве 2,66 $\mu\text{г}$ на 1 г материала			Обнаружено витамин В ₁ в % от вытго его количества
	до добавления	должно быть после добавления	фактически найдено	
Пшеница (зерно)	3,22	5,88	6,00	102
Мука пшеничная (72%-ного выхода)	3,14	5,80	5,70	98
Гречневая мука	7,00	9,66	9,66	100
Горох (семена)	9,71	12,37	12,00	97
Фасоль (семена)	8,50	11,16	11,16	100
» (листья)	1,31	3,97	4,05	102
Картофель (сердцевина клубни)	0,71	3,37	3,47	103
» (кожура клубни)	0,52	3,18	3,18	100
Печень говяжья	0,56	3,22	3,32	103
» кита	3,09	5,75	5,70	99
Молоко коровье	0,18	2,84	2,87	101
Сухари ржаные	2,43	5,09	5,09	100
Моча человека	0,79	3,45	3,52	102
Дрожжи пекарские прессованные	9,02	11,68	11,90	102

Следует отметить, что величины флуоресценции для окисленных и неокисленных проб с декальсо и катионитом СДВ-3 во всех случаях были очень близки друг к другу, что также указывает на одинаковый характер их действия. Регенерацию катионита СДВ-3 производили так же, как это принято для адсорбента декальсо [9], но при температуре не выше 60—70°.

Для получения хорошей воспроизводимости результатов анализа следует придерживаться следующих дополнительных указаний:

1) элюцию следует производить 30 мл 25%-ного раствора КСl в 0,1 н. НСl порциями по 6—7 мл, а не 25 мл [9];

2) разница в концентрации витамина В₁ между стандартными и испытуемым растворами не должна быть больше чем в 1,5 раза; если эта разница больше, то следует приготовить дополнительный стандартный раствор;

3) в качестве смазки для кранов и пробок рекомендуется использовать глицерин, но не вазелин, ибо последний содержит много флуоресцирующих примесей.

шом содержании примесей в исследуемом объекте, что видно из табл. 3.

Таблица 3

Сравнительное определение витамина В₁ различными методами

Наименование объекта	Содержание витамина В ₁ в $\mu\text{г}$ на 1 г объекта естественной влажности			$\frac{\text{II}-\text{I}}{\text{I}}$ %
	без адсорбента	с декальсо (I)	с катионитом СДВ-3 (II)	
Пшеница (зерно)	—	3,22	3,14	-2,5
Мука пшеничная (72%-ного выхода)	1,61	3,14	3,20	+2
Гречневая каша	—	7,00	7,00	0
Горох (семена)	—	9,71	9,66	-0,5
Фасоль (семена)	5,36	8,5	8,5	0
» (листья)	1,31	1,31	1,31	0
Картофель (середины клубни)	0,78	0,71	0,72	+1
» (кожура клубни)	0	0,52	0,51	-2
Печень говяжья	0,47	0,56	0,56	0
» кита	—	3,09	3,09	0
Молоко коровье	0,170	0,180	0,178	-1
Сухари ржаные	0,131	2,43	2,43	0
Моча человека	0	0,79	0,79	0
Дрожжи пекарские прессованные	—	9,02	9,02	0

Из табл. 3 видно не только хорошее совпадение результатов, получаемых во всех случаях для декальсо и катионита СДВ-3, но и возможность определения витамина В₁ в ряде объектов (листья фасоли, картофель, молоко) без адсорбентов. Само собою разумеется, что контрольные анализы необходимы всякий раз при решении вопроса о допустимости упрощенного анализа.

Убедившись в пригодности катионита СДВ-3 для замены декальсо, мы дополнительно определили содержание витамина В₁, присутствовавшего в объектах исследования, а также добавленного к 5%-ным вытяжкам из материала (2 $\mu\text{г}$ на 15 мл, что составило 2,66 $\mu\text{г}$ на 1 г материала). Полученные результаты помещены в табл. 4.

Из табл. 4 видно, что добавленный к объектам исследования витамин В₁ был обнаружен в количестве 97—103 %.

Таблица 4

Определение витамина В₁, присутствовавшего в объектах исследования и добавленного к ним, по методу с катионитом СДВ-3

Наименование объекта	Содержание витамина В ₁ до и после добавления его в количестве 2,66 $\mu\text{г}$ на 1 г материала			Обнаружено витамин В ₁ в исследуемом объекте
	до добавления	должно быть после добавления	фактически найдено	
Пшеница (зерно)	3,22	5,88	6,00	102
Мука пшеничная (72%-ного выхода)	3,14	5,80	5,70	98
Гречневая мука	7,00	9,66	9,66	100
Горох (семена)	9,71	12,37	12,00	97
Фасоль (семена)	8,50	11,16	11,16	100
» (листья)	1,31	3,97	4,05	102
Картофель (середины клубни)	0,71	3,37	3,47	103
» (кожура клубни)	0,52	3,18	3,18	100
Печень говяжья	0,56	3,22	3,32	103
» кита	3,09	5,75	5,70	99
Молоко коровье	0,18	2,84	2,87	101
Сухари ржаные	2,43	5,09	5,09	100
Моча человека	0,79	3,45	3,52	102
Дрожжи пекарские прессованные	9,02	11,68	11,90	102

Следует отметить, что величины флуоресценции для окисленных и неокисленных проб с декальсо и катионитом СДВ-3 во всех случаях были очень близки друг к другу, что также указывает на одинаковый характер их действия. Регенерацию катионита СДВ-3 производили так же, как это принято для адсорбента декальсо [9], но при температуре не выше 60—70°.

Для получения хорошей воспроизводимости результатов анализа следует придерживаться следующих дополнительных указаний:

1) элюцию следует производить 30 мл 25%-ного раствора КСl в 0,1 н. НСl порциями по 6—7 мл, а не 25 мл [9];

2) разница в концентрации витамина В₁ между стандартными и испытуемым растворами не должна быть больше чем в 1,5 раза; если эта разница больше, то следует приготовить дополнительный стандартный раствор;

3) в качестве смазки для кранов и пробок рекомендуется использовать глицерин, но не вазелин, ибо последний содержит много флуоресцирующих примесей.

стандартного раствора витамина В₁ с содержанием 1 мкг в 1 мл в тех же условиях соответствует 79 делениям гальванометра. Из табл. 1 видно, что наилучшее отделение примесей (см. вторые цифры) достигается при обработке декальсо, обработка по Елисейной почти не уменьшает их содержания по сравнению с необработанным материалом, способ Труфанова и Кирсановой в этом отношении несколько лучше, но также недостаточно эффективен.

Освобождение от примесей путем применения адсорбентов

В опытах с адсорбентами мы использовали четыре катионита, изготовленные проф. И. П. Лосевым и А. С. Тевлиной в Московском химико-технологическом институте им. Д. И. Менделеева и любезно нам предоставленные. Пользуемся случаем выразить им благодарность.

Помимо этого испытывали природные бентонитовые адсорбенты асканит и гумбрин, а также силикагель, которые также можно рассматривать как обладающие катионо-обменными свойствами [5, 6, 10, 11, 12, 13], а витамин В₁ — как катион [14]. Для сравнения был использован декальсо.

Исходя из многочисленных указаний о трудности десорбции витамина В₁ с природных адсорбентов и катионитов, мы исследовали этот вопрос с чистым витамином. Силикагель марки АСК и различные катиониты предварительно измельчали примерно до такой же степени, как адсорбент декальсо (фрагменты от 0,5 до 0,13 мм — 70%, меньше 0,13 — 30%). Адсорбенты и катиониты обрабатывали трехкратно 10%-ной НСІ каждый раз по 2 часа при 40—60° для освобождения от примесей желсаа. Затем адсорбенты активировали так же, как это принято для адсорбента декальсо, т. е. при температуре около 100° [9], а катиониты — при температуре не выше 60—70° ввиду их термолабильности. Для адсорбции брали по 50 мкг витамина В₁ в 10 мл воды и пропускали через адсорбционные трубки с внутренним диаметром 3 мм и высотой столбиков адсорбентов, равной 6 см, катионитов — 8 см (вес каждого столбика около 2 г). Степень адсорбции проверяли во всех случаях. Первую элюцию проводили 25%-ным раствором КСІ в 0,1 н. НСІ при 70—90°, вторую — 18%-ной НСІ без нагревания. Для элюции в обоих случаях применяли около 25 мл раствора, порциями по 6—7 мл 3—4 раза. Полученные данные представлены в табл. 2.

Таблица 2

Сравнение полноты элюции витамина В₁ с различными адсорбентами

Наименование адсорбента	Количество обнаруженного витамина В ₁ в процентах от взятого его количества	
	1-я элюция — 25%-ным раствором КСІ в 0,1 н. НСІ	2-я элюция — 18%-ным раствором НСІ
Декальсо	100	0
Асканит	0	32
Гумбрин	0	78
Силикагель АСК	100	0
Катиониты:		
МСФ	0	14
МСФ-3	0	48
СБС	0	20
СДВ-3	100	0

Из табл. 2 видно, что первая элюция дает 100%-ный выход витамина А только при использовании декальсо, силикагеля АСК и катионита СДВ-3.

Для исследования сравнительной сорбционной емкости адсорбентов через адсорбционные трубки с декальсо, силикагелем АСК и катионитом СДВ-3 пропускали раствор витамина В₁ в концентрации 100 мкг в 1 мл воды со скоростью 60 мл/час. Прекращение поглощения витамина наблюдалось только после сорбции соответственно 26, 62 и 218 мг на 2 г каждого адсорбента. Таким образом, катионит СДВ-3 обладает примерно в 8 раз большей сорбционной емкостью, чем декальсо. Этим можно воспользоваться не только для аналитических целей, но и для очистки и концентрирования витамина В₁, например при синтетическом его производстве.

Проведя многочисленные испытания катионита СДВ-3 и силикагеля АСК по сравнению с декальсо на различных объектах, мы пришли к выводу, что силикагель АСК дает недостаточно воспроизводимые результаты, в то время как катионит СДВ-3 во всех случаях давал отличное совпадение данных с результатами, полученными с декальсо, даже при очень боль-

тем меньшие количества исследуемого вещества можно обнаружить. При работе со стеринами 23%-ный раствор треххлористой сурьмы в хлороформе оказался мало чувствительным реактивом для эргостерина и совсем непригодным для проявления холестерина в количествах до 20 мг. Судя по литературным данным, очень чувствительным реактивом на стерин является 20%-ный раствор пятихлористой сурьмы в хлороформе, но в нашем распоряжении этого реактива не было.

Пулверизация хроматограммы раствором треххлористой сурьмы сопряжена с большими затруднениями и вредностью. Для преодоления этих трудностей была подобрана концентрация треххлористой сурьмы, пригодная для определения указанных стеринов, и разработан безвредный способ проявления хроматограмм. Разделение стеринов оказалось затруднительным вследствие близкого сходства их строения (табл. 1).

Таблица 1
Основные свойства некоторых стеринов

Наименование стерина	Молекулярный вес	Количество двойных связей в молекуле	Наличие активных групп
Эргостерин	386,6	3	—ОН
Холестерин	386,6	1	—ОН
7-Дегидрохолестерин	384,6	2	—ОН
Витамин D ₂	386,6	4	—ОН
Витамин D ₃	384,6	3	—ОН

Как видно, из активных групп, имеющих значение в хроматографии, у стеринов есть только гидроксильная группа, причем все указанные стеринны, а их различия по молекулярному весу весьма незначительны. Единственным различием между ними является только число двойных связей. Все это усложняло подбор подвижной фазы для разделения смесей стеринов, состоящей из эргостерина, холестерина, 7-дегидрохолестерина и витаминов D₂ и D₃. Было испытано несколько десятков комбинаций из разных растворителей: метилового, этилового, пропилового, нормального бутилового, изоамилового и бензилового спиртов, диоксиана, бензола, толуола, ксилола, ацетона, фенола, петролейного эфира и диэтиламина. Были проверены также хлорсодержащие растворители: хлороформ, 4-хлористый углерод и дихлорэтан.

Исследование перечисленных растворителей показало, что посредством одних из них получают небольшие компактные пятна стеринов, ярко проявляющиеся раствором треххлористой сурьмы (хлорсодержащие растворители и нормальный бутиловый спирт), но эти растворители непригодны в качестве подвижной фазы, так как дают одинаковую величину R_f для всех стеринов.

Другие растворители, особенно различной крепости диоксан и спирты метиловый и этиловый, разделяют стеринны, но для четкого разделения требуются подбор и особая обработка хроматографической бумаги.

Было испытано более десятка различных сортов хроматографической бумаги без применения и с применением той или иной обработки. Бумагу отмывали соляной кислотой, подвергали ацетилированию [3], на нее наносили раствор KH_2PO_4 различной концентрации (M/2, 1 M и 2 M). Была проверена роль пропитывания бумаги растворами касторового масла, парафина, вазелина, стеариновой и пальмитиновой кислот. Испытание целого ряда подвижных фаз, отмывания и пропитывания бумаги показало, что стеринны можно разделить только при сочетании нескольких подвижных фаз, специфичных для отдельных стеринов, и определить их при использовании в качестве свидетелей химически чистых стеринов и витаминов D₂ и D₃.

Наиболее пригодной оказалась хроматографическая бумага № 2, изготавливаемая Ленинградской бумажной фабрикой № 2 им. Володарского. На этой бумаге и были проведены все работы по разделению стеринов. Помимо качественного обнаружения, витаминов группы D в природных продуктах определяли количественно после отделения стеринов вымораживанием. Вымораженные стеринны в свою очередь собирали для дальнейшего разделения их на бумаге.

НЕОБХОДИМЫЕ РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Реактивы

1. Метиловый спирт, перегнанный над сухим NaOH или KOH с отбором фракции при 65°.
2. Этиловый спирт для освобождения от альдегидов оставляют на ночь с твердым химически чистым NaOH (10 г на 1 л спирта) и затем отгоняют. Наиболее тщательной очистки спирта

5. Вадимов В. М. Биологический и спектрографический методы исследования препаратов витаминов D. Пищепромиздат, 1946.
6. Ewing D. T., Powell M. J., Brown R. A. a. Emmett A. D. Determining vitamin D₂ by two physical-chemical methods.—Anal. Chem., 20, 317 (1948).
7. Lamb F. W., Müller A. a. Reach C. W. Quantitative determination of ergosterol, cholesterol and 7-dehydrocholesterol by antimony trichloride method.—Ind. Eng. Chem., 18, 187 (1946).
8. Sobel A. E., Mayer A. M. a. Kramer B. New colorimetric reaction of vitamins D₂ and D₃ and their provitamins. — Ind. Eng. Chem., 17, 190 (1945).
9. Campbell J. A. Modified glycerol dichlorhydrin reaction for vitamin D₂.—Anal. chem., 20, 766 (1948).
10. Ewing D. T., Kingsley G. V., Brown W. A. a. Emmett A. D. Physical-chemical method for determination of vitamins D in fish liver oils.—Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 15, 301 (1943).
11. Nield C. H., Russell W. C. a. Zimmerli A. The spectrophotometric determination of vitamins D₂ and D₃.—J. Biol. chem., 148, 245 (1943).
12. De Witt J. B. a. Sullivan M. X. Spectrophotometric procedure for quantitative estimation of vitamins D.—Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 18, 117 (1946).
13. Велдт В. П. Методы количественного определения жирорастворимых витаминов A, D₂ и E.—Витамины. 1. Методы исследования, естественные ресурсы и биохимия витаминов. Изд. Ака наук УССР, Киев, 1953.
14. Green J. Studies on the analysis of vitamins D.—Biochem. J., 49, pp. 36—58 a. 232—246 (1951).

И. Н. ГАРКИНА

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД РАЗДЕЛЕНИЯ ПРОВИТАМИНОВ И ВИТАМИНОВ D

Метод хроматографии на бумаге за последние годы получил широкое применение для качественного и отчасти количественного анализа органических и особенно неорганических соединений.

Разделение сложных органических смесей хорошо разработано в отношении аминокислот, сахаров, антибиотиков, ряда алкалоидов и других водорастворимых соединений. Разделение смеси не растворимых в воде соединений методом хроматографии на бумаге еще недостаточно разработано в силу большой сложности вопроса. Имеются лишь отдельные работы по разделению витаминов E, витаминов A; особенно успешно было проведено разделение кетостероидов после предварительного их перевода в гидразоны с реактивом Герарда [1]. По разделению самих стероидов только начинают появляться отдельные работы [2]. Хроматографическое разделение стероидов имеет большое значение не только потому, что к ним относятся интересные витаминную промышленность провитамины и витаминные группы D, но и потому, что обмен стероидов привлекает все большее внимание работников теоретической и практической медицины.

Нашей задачей являлась разработка метода разделения стероидов путем хроматографии на бумаге с целью характеристики природных материалов в отношении содержания в них провитаминов и витаминов D. Следует сказать, что при проведении данной работы были встречены весьма значительные затруднения, которые мы и стремились преодолеть.

В хроматографии на бумаге большое значение имеет проявление разделяемых соединений. Чем чувствительнее проявитель,

ство тахистерина вычисляют по разности между результатами определения в анализируемой пробе без конденсации с малеиновым ангидридом и с конденсацией. При расчете содержания витамина D учитывают все сделанные в ходе анализа разведения.

Пример расчета. К 1 мл спиртового концентрата витамина D прибавляли 9 мл спирта. Из этого раствора на анализ был взят 1 мл. На цветную реакцию с треххлористой сурьмой взято 0,5 мл. Всего колориметрируемого хлороформенного раствора было 15 мл. Экстинкция проб без конденсации с малеиновым ангидридом $E = 0,36$.

По калибровочной кривой экстинкции 0,36 соответствуют 900 инт. ед. в 0,5 мл колориметрируемого раствора,
 $900 \times 2 = 1800$ инт. ед. в 1 мл колориметрируемого раствора,
 $1800 \times 15 = 27\ 000$ инт. ед. в 15 мл колориметрируемого раствора,
 $27\ 000 \times 10 = 270\ 000$ инт. ед. в 1 мл спиртового концентрата.

После конденсации с малеиновым ангидридом экстинкция $E = 0,29$;

$0,29 = 775$ инт. ед. (в 0,5 мл колориметрируемого раствора),
 $775 \times 2 = 1550$ инт. ед. (в 1 мл колориметрируемого раствора),
 $1550 \times 15 = 23\ 250$ инт. ед. (в 15 мл колориметрируемого раствора),
 $23\ 250 \times 10 = 232\ 500$ инт. ед. витамина D в 1 мл спиртового концентрата,
 $270\ 000 - 232\ 500 = 37\ 500$ инт. ед. приходится на долю тахистерина.

Следовательно, в 1 мл анализируемого спиртового концентрата содержится: 232 500 инт. ед. витамина D (86%), а обнаруженные сверх этого 37 500 инт. ед. (14%) обуславливаются окраской, развиваемой тахистеринном.

Если определение тахистерина не требуется, то весь ход анализа без конденсации с малеиновым ангидридом опускают и расчет витамина D производит по примеру, указанному для пробы, обработанной малеиновым ангидридом.

Приведенный анализ спиртовых концентратов позволяет контролировать процесс облучения эргостерина и определять:

1) процент подвергнутого фотолузу эргостерина (смолки) путем определения количества непрореагировавшего эргостерина по реакции с дигитонином и вычитания этой величины из начального его содержания в облучаемом растворе;

2) процентное содержание в смолке витамина D путем проведения полного анализа;

3) процентное содержание в смолке тахистерина по разности между определениями без конденсации с малеиновым ангидридом и с конденсацией (по п. 2);

4) процентное содержание прочих фотопроизводных в смолке по разности между общим ее количеством (п. 1) и суммой витамина D и тахистерина.

ВЫВОДЫ

1. Разработан химический метод количественного определения витамина D в облученных и необлученных рыбных жирах, а также в масляных и спиртовых концентратах, получаемых путем облучения эргостерина.

2. Метод основан на осаждении стерина дигитонином, удалении из растворов тахистерина путем его конденсации с малеиновым ангидридом и отделении витамина A и других мешающих определению веществ при помощи адсорбции на бентоните. В подготовленных для анализа очищенных растворах определение витамина D производят по реакции с треххлористой сурьмой в хлороформе, пользуясь в качестве стандарта для сравнения растворами чистого кристаллического витамина D₂.

3. Метод позволяет контролировать процесс облучения эргостерина в отношении общего выхода фотодериватов (смолки) и содержания в них витамина D, тахистерина и суммы прочих фотопроизводных.

4. Сопоставление определений витамина D разработанным химическим методом с биологическими испытаниями показало хорошее совпадение, укладывающееся в среднем в $\pm 12,0\%$.

Литература

1. Гаркина И. Н. и Букин В. Н. Химический метод определения витамина D в рыбных жирах. — Биохимия, 16, вып. 2, 1951.
2. Букин В. Н. и Ерофеева Н. П. Биологический метод определения и результаты испытания рыбных жиров и других продуктов морского промысла на витамин D. — Витаминные ресурсы и их использование. Сб. 1. Витаминные ресурсы рыбной промышленности. Изд. АН СССР, 1951.
3. Гудлет М. А. О химическом определении витамина D в рыбных жирах (1-е сообщение). — Витамин в теории и практике, 1, вып. 3, стр. 35. Пищепромиздат, 1941.
4. Энгельгардт В. А. и Татарская Р. И. Сборник технологических инструкций по производству витаминов. Пищепромиздат, 1943.

в течение длительного периода маслах. Адсорбцию на бентоните проводят так же, как описано выше в разделе I.

Собранные бесцветные элюаты концентрируют в вакууме на водяной бане при температуре не выше $35-40^\circ$ до 10—15 мл и этот хлороформенный раствор употребляют для колориметрирования, которое проводят, как описано выше (см. раздел I).

Пример расчета. На анализ было взято 1 г концентрата витамина D₂ в масле. После конденсации тахистерина, осаждения стернов и хроматографической очистки было приготовлено 15 мл хлороформенного раствора для колориметрирования. При колориметрировании 0,5 мл была получена величина экстинкции $E = 0,47$. По калибровочной кривой величине экстинкции 0,47 соответствует содержание 2115 инт. ед. витамина D.

2115 инт. ед. содержится в 0,5 мл колориметрируемого раствора.

$2115 \times 2 = 4230$ инт. ед. в 1 мл колориметрируемого раствора.

$4230 \times 15 = 63450$ инт. ед. в 15 мл колориметрируемого раствора или в 1 г анализируемого масляного раствора.

Если ставят задачу количественного определения наряду с витамином D также тахистерина, то количество тахистерина рассчитывают по разности между результатами определения без конденсации с малеиновым ангидридом и после конденсации. Подробный ход такого анализа приведен ниже, при описании метода определения витамина D в спиртовых растворах облученного эргостерина.

III. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА D В СПИРТОВЫХ РАСТВОРАХ ОБЛУЧЕННОГО ЭРГОСТЕРИНА

Для анализа берут такое количество миллилитров спиртового раствора витамина D, в котором содержится около 80 000 инт. ед. витамина. Для этого малоактивные спиртовые растворы концентрируют в вакууме, густой раствор охлаждают, эргостерин отфильтровывают и для анализа берут 1 или 2 мл фильтрата, учитывая предполагаемое содержание в 1 мл высокоактивных спиртовых растворов, содержащие в 1 мл 200 000 — 300 000 инт. ед. витамина D и более, разбавляют спиртом соответственно в 10 или 20 раз. Для разбавления в 10 раз к 1 мл спиртового концентрата приливают 9 мл спирта. При расчетах содержания витамина D учитывают это разведение. Из приготовленного раствора берут 1 или 2 мл,

помещают в колбу Вюрца, кладут кусочек пемзы, отгоняют в вакууме спирт, затем приливают 5 мл бензола и также в вакууме при $35-40^\circ$ его отгоняют с целью удаления вместе с ним следов спирта и влаги. К сухому остатку приливают 10 мл бензола, определенное количество 0,7%-ного бензольного раствора или навеску сухого малеинового ангидрида по расчету, указанному в методе определения витамина D в масляных растворах (см. раздел II), и проводят конденсацию тахистерина, как описано в разделе I. По окончании конденсации бензол отгоняют в вакууме при $40-45^\circ$ досуха, к сухому остатку прибавляют 10 мл этилового спирта и осаждают стерны дигитонином (см. раздел I). Фильтрат после удаления дигитонида разбавляют в 2 раза водой и экстрагируют 4 раза эфиром (каждый раз по 25 мл эфира).

Для подлежащих анализу растворов, приготовленных из спиртовых концентратов с активностью 100 000 инт. ед. и выше в 1 мл, незначительными следами эргостерина пренебрегают и операцию их осаждения дигитонином опускают. В этом случае сухой остаток после конденсации переносят (10—15 мл) спиртом в делительную воронку, туда же приливают равный объем воды и экстрагируют 4 раза эфиром порциями по 25 мл.

Эфирный экстракт отмывают водой 3 раза по 40 мл от спирта, избытка малеинового ангидрида и дигитонида (если последний применялся), сушат серпосильным натрием и эфир отгоняют в вакууме. К сухому остатку прибавляют 5 мл хлороформа и в вакууме отгоняют вместе с хлороформом следы влаги.

Сухой остаток растворяют в 10 или 20 мл хлороформа и этот раствор употребляют для колориметрирования (определение витамина D без тахистерина).

Для определения содержания витамина D в сумме с тахистерином конденсацию с малеиновым ангидридом опускают. При этом также берут 1 или 2 мл приготовленного для анализа исходного раствора, помещают в химический стаканчик, приливают 8—10 мл этилового спирта и осаждают стерны дигитонином. Осадок дигитонида отфильтровывают, фильтрат переносят в делительную воронку, приливают 10 мл воды и экстрагируют эфиром (4 раза по 25 мл). Соединенные эфирные экстракты отмывают водой (3 раза по 40 мл), сушат серпосильным натрием и эфир отгоняют. К сухому остатку приливают 5 мл хлороформа, хлороформ отгоняют, сухой остаток растворяют в 10 или 20 мл хлороформа (как и при анализе с удалением тахистерина), полученный раствор употребляют для колориметрирования, которое проводят, как описано в разделе I.

ствии пиридоксаль и пиридоксамин. Во многих пищевых продуктах, являющихся богатым источником витамина В₆, последний присутствует преимущественно в виде пиридоксали и пиридоксамина.

Витамин В₆, или пиридоксин, можно получить путем экстракции его из природного материала или путем синтеза.

Ниже приводятся физическая характеристика и свойства пиридоксина.

Пиридоксин

Внешний вид соединения (основания) — бесцветный, кристаллический порошок.

Внешний вид его солянокислой соли — белый порошок.

Эмпирическая формула — C₈H₁₁O₃.

Молекулярный вес основания — 169.

Точка плавления основания — 160°.

» » гидрохлорида пиридоксина — 204—206°.

pH водного раствора гидрохлорида пиридоксина — 3,2.

Максимум абсорбции — 320 мμ.

Растворимость пиридоксина (основания):

легко растворим	в воде
» »	в этиловом спирте
плохо растворим	в диэтиловом эфире
» »	в хлороформе
легко растворим	в ацетоне

Растворимость гидрохлорида пиридоксина:

22,2 г в 100 мл воды,

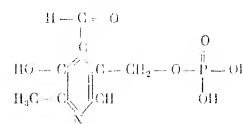
1,1 » » 100 этилового спирта,

плохо растворим в ацетоне.

Витамин В₆ чувствителен к действию света и устойчив по отношению к нагреванию, к кислоте и щелочи. Он адсорбируется на активном угле и фуллеровой земле из нейтральных и кислых растворов и осаждается серной, фосфорновольфрамовой и кремневольфрамовой кислотами. Пиридоксин легко димеризуется и возгоняется.

Этот витамин играет важную роль в обмене веществ. Его производное — пиридоксальфосфат входит в качестве кофер-

мента в состав ферментов, катализирующих превращения аминокислот: декарбоксилирование, переаминирование, реакции с участием метиленовых групп, синтез и неокислительный распад триптофана. Витамин В₆ связан также с использованием ненасыщенных жирных кислот.



Пиридоксальфосфат

Большая часть животных и растений способна синтезировать витамин В₆, и лишь немногие виды нуждаются в получении его извне. Недостаток в пиридоксине у животных приводит к заболеванию кожи и нарушениям в белковом и жировом обмене.

Наибольшие количества витамина В₆ (25—50 мг/г) содержат дрожжи, рисовые отруби и пшеничные зародыши.

Многочисленные методы определения витамина В₆ могут быть разделены на 4 категории: физические, химические, микробиологические и биологические (с использованием животного организма). Однако ни одна из этих категорий методов не позволяет провести достаточно удовлетворительно раздельное определение указанных трех форм витамина.

Наиболее точно, просто и быстро пиридоксин (витамин В₆) может быть обнаружен и количественно определен микробиологическими методами. Предложенные химические методы достоверны только при исследовании чистых растворов этого витамина, биологические методы с использованием животных очень длительны и громоздки. Таким, очевидно, и объясняется то обстоятельство, что микроорганизмы, нуждающиеся в получении извне пиридоксина или его производных (пиридоксали и пиридоксамин), были широко испытаны как индикаторы на этот витамин.

Для этой цели в разное время были предложены бактерии *Lactobacillus casei* и *Streptococcus faecalis* [1]. Хотя при помощи бактерий удается определить отдельно пиридоксин, пиридоксаль и пиридоксамин, однако искусственные среды для культивирования этих индикаторных организмов столь сложны и

ВЫВОДЫ

1. Пользуясь штаммом молочнокислой бактерии *Lactobacillus arabinosus*, дефектным в отношении биосинтеза никотиновой кислоты (витамина PP), подобран и испытан метод определения этого витамина.

2. Метод является высокоспецифичным и чувствительным, позволяя вести определения при наличии 2—4 мкг никотиновой кислоты (витамина PP) во взятой навеске испытуемого образца.

Литература

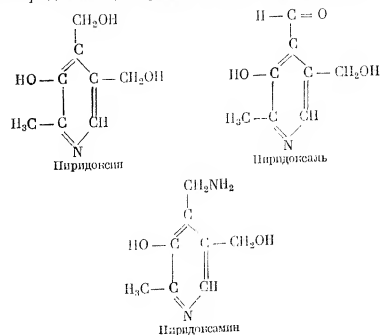
4. Methods of vitamin assay. New York, 1951.
5. С п е л ь Э. Микробиологические методы определения витаминов. Сб. статей «Микробиологические методы определения витаминов и аминокислот», ИЛ, 1954. Под ред. К. Л. Поголоцкий.

Н. А. ПОМОЩНИКОВА

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПИРИДОКСИНА (ВИТАМИНА B₆)

Витамин B₆, или пиридоксин, является широко распространенным витамином группы B.

Он входит в состав различных пищевых продуктов животного и растительного происхождения. Большая часть витамина B₆ находится в связанной форме, в комплексе с белком или с крахмалом. Установлено, что B₆ существует в 3 формах: в виде пиридоксена, пиридоксала и пиридоксамина:

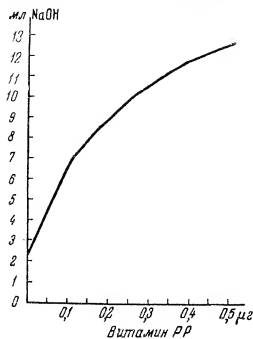


Пиридоксин, идентифицированный и изолированный ранее двух других соединений, получил название витамина B₆, которое затем было распространено также на открытые впослед-

10 Витаминные ресурсы

Х. Обработка результатов и вычисление содержания никотиновой кислоты

Стандартную кривую вычерчивают на основе средних значений количества миллилитров NaOH, использованных при титровании, или показаний гальванометра при нефелометрии для каждой точки стандартного раствора никотиновой кислоты. На оси абсцисс откладывают абсолютные количества никотиновой кислоты, содержащиеся в каждой пробирке, на оси ординат — средние значения количества миллилитров 0,05 н. NaOH; соединяя точки пересечения, получают стандартную кривую,



образец которой дается на рисунке. Пользуясь ею, путем интерполирования определяют содержание никотиновой кислоты в каждой из пробирок с испытуемым раствором. Далее вычисляют содержание никотиновой кислоты в миллилитре испытуемого раствора для каждой пробирки отдельно. Содержание никотиновой кислоты в испытуемом растворе вычисляют на основании результатов, полученных не менее, чем с тремя пробирками, которые не отличаются более чем на $\pm 10\%$ от среднего значения.

Конечную величину выразают обычно в микрограммах на 1 г воздушно-сухого или абсолютно-сухого испытуемого вещества или на 1 мл исходной жидкости (молоко, плазма и т. д.).

В табл. 3 приведен пример определения содержания никотиновой кислоты в пшеничной обойной муке.

В заключение в табл. 4 приводим содержание никотиновой кислоты в ряде пищевых объектов растительного и животного происхождения.

Таблица 3
Пример определения содержания никотиновой кислоты в пшеничной обойной муке (навеска 1 г, разведение 1:500)

№ пробирки	Количество никотиновой кислоты, добавленной в пробирку, в мг	Количество 0,5 н. NaOH, пошедшее на титрование, в мл	Обнаружено никотиновой кислоты (в мг)		
			в пробирке	в 1 мл добавленной пшеницы	в 1 г навески
1	0,5	4,2	0,040	0,080	40,0
2	0,5	4,4	0,042	0,084	42,0
3	1	5,9	0,082	0,082	41,0
4	1	5,9	0,082	0,082	41,0
5	1,5	7,4	0,130	0,086	43,0
6	1,5	7,3	0,127	0,084	42,0
7	2	8,4	0,175	0,087	43,5
8	2	8,5	0,180	0,090	45,0
9	2,5	9,0	0,210	0,084	42,0
10	2,5	8,9	0,200	0,080	40,0
В среднем					41,9

Таблица 4
Содержание никотиновой кислоты в различных природных источниках (в мг на 1 г)

Объект исследования	Содержание никотиновой кислоты	Объект исследования	Содержание никотиновой кислоты
Растительные продукты:		Животные продукты:	
Рожь	4,4—43,4	Морковь	4—14,7
Пшеница	44—71	Свекла	3—6
Пшеничная мука:		Яблоко	0,9—5
высший сорт	7—13,5	Салат	2—5
I сорт	12,5—18,5	Крупный рогатый скот:	
II сорт	16,5—35,8	мясо	46—63,9
Пшеничные отруби	245—286	печень	78—275
Ячмень	56—87	почки	73—100
Гречиха	56	сердце	68—84
Кукуруза желтая	20	Куры:	
Овес	7	грудка мясная	86—151
Горох	22	мясо ноги	72
Подсолнух	38	печень	80—152
Соя	21	Треска	23
Дрожжи пекарские сухие	250—500	Мясные продукты	6,8—1,0
Картофель	11,8	Яйца	1,0
Капуста	1,2—4		

4. Раствор аденин-гуанин-урацила. Отвешивают по 0,1 г аденинсульфата, гуанин-гидрохлорида и урацила, навески смешивают и растворяют в 20%-ной HCl при длительном кипячении в водяной бане, доводят после охлаждения до 100 мл и сохраняют в холодильнике.

5. Растворы витаминов. Отвешивают по 10 мг:

- а) тиамин-гидрохлорида,
- б) пантотената кальция,
- в) пиридоксин-гидрохлорида,
- г) рибофлавина,
- д) никотиновой кислоты,
- е) пара-аминобензойной кислоты,

и растворяют отдельно каждый витамин в дистиллированной воде в мерных колбах на 100 мл и доводят до метки.

Рибофлавин растворяют при нагревании в кипящей бане. Растворы рибофлавина и пиридоксина необходимо сохранять в темных склянках. Все растворы витаминов сохраняют в холодильнике в склянках под слоем толуола,

ж) раствор биотина готовят с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержалось 0,2 мкг вещества. Раствор разливают по пробиркам и стерилизуют в автоклаве при 1 атм. в течение 15 минут.

6. Раствор солей (А). Растворяют 25 г одноосновного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4) и 25 г двуосновного фосфорнокислого калия (K_2HPO_4) в 250 мл дистиллированной воды. Раствор солей сохраняют в холодильнике.

7. Раствор солей (Б). Растворяют 10 г сернокислого магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,5 г хлористого натрия (NaCl), 0,5 г сернокислого железа ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и 0,5 г сернокислого марганца ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) и доводят объем до 250 мл. Сохраняют в холодильнике.

III. Составление основной среды

Наиболее пригодной является основная среда следующего состава (табл. 2).

Ингредиенты вводят в указанной последовательности в колбу на 1 л, содержащую 500 мл дистиллированной воды, каждый раз тщательно перемешивая. Затем доводят водой почти до одного литра, подщелачивают до pH 6,8, прибавляя 5 н. NaOH и добавляют воду точно до литра.

Таблица 2

Состав основной среды

Наименование составных частей	Весовое количество	Пеходные растворы в мл
Глюкоза	20 г	—
Уксуснокислый натрий ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	20 г	—
Казеиновый гидролизат, свободный от витаминов	10 г	100
dl-тринтофан	0,1 г	20
l-цистин	0,2 г	40
Аденин, гуанин, урацил	по 0,02 г	20
Тиамин-гидрохлорид	0,2 мг	2
Пантотенат кальция	0,2 г	2
Пиридоксин-гидрохлорид	0,4 г	4
Рибофлавин	0,4 г	4
Пара-аминобензойная кислота	0,2 г	2
Биотин	0,00080 г	4
Раствор солей (А)	—	10
K_2HPO_4	1 г	—
KH_2PO_4	1 г	—
Раствор солей (Б)	—	10
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4 г	—
NaCl	0,02 г	—
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02 г	—
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,02 г	—

IV. Выращивание пеходной культуры *Lactobacillus arabinosus*

К 90 мл дистиллированной воды добавляют 10 мл дрожжевого автолизата*, 1 г глюкозы и 1,5—2 г агар-агара. Нагревают смесь в водяной бане до растворения агара, разливают по пробиркам еще горячий раствор, закрывают пробирки ватными пробками и стерилизуют в автоклаве при 1 атм. в течение 15 минут, охлаждают в наклонном положении. Засевают не менее 2—3 пробирок культурой *Lactobacillus*.

* Дрожжевой автолизат готовят следующим образом: к 200 г прессованных дрожжей добавляют 200 мл прокипяченной и остуженной до 60° воды. Размешивают в гомогенизирующей массе, добавляют 0,5 мл толуола и ставят в термостат на 48 час. при 50°. После этого 30 мин. нагревают в автоклаве при 0,5 атм. давления. Затем несколько раз фильтруют через поронку Бюхнера до получения прозрачной жидкости. Осадок промывают 120 мл воды и фильтрат присоединяют к основной жидкости.

Эта реакция положена в основу распространенного химического цианбромидного метода определения никотиновой кислоты. Данный метод является более быстрым по сравнению с микробиологическим методом, но в то же время менее специфичным и чувствительным, дает завышенные результаты, особенно при испытании сильно пигментированных вытяжек [1]. Обзор микробиологических методов приведен Снеллом [2].

При анализе материалов следует учитывать, что наиболее богаты витамином РР дрожжи, печень, мясо, рыба и зерно злаков (например, пшеница, ячмень). Рожь, овес и кукуруза бедны никотиновой кислотой. Ниже дается описание микробиологического метода определения никотиновой кислоты со штаммом молочнокислой бактерии *Lactobacillus arabinosus*, чувствительным к недостатку этого витамина в питательной среде.

Микробиологический анализ распадается на следующие этапы:

1. Подготовка испытуемого образца для анализа.
2. Приготовление растворов для основной питательной среды.
3. Составление основной питательной среды.
4. Выращивание исходной культуры *Lactobacillus arabinosus*.
5. Приготовление стандартного раствора никотиновой кислоты.
6. Приготовление культуральной среды.
7. Приготовление посевного материала.
8. Постановка опыта.
9. Учет интенсивности роста *Lactobacillus arabinosus*.
10. Обработка результатов и вычисление содержания никотиновой кислоты в исследуемых образцах.

I. Подготовка испытуемого образца для анализа

1—2 г вещества тщательно растирают в ступке с 2—3 мл 1 н. соляной кислоты и переносят в мерную колбу, споласкивая ступку 47—48 мл той же кислоты. Если исследуемый образец — жидкость, то берут 10—20 мл, добавляют 35,8—25,8 мл дистиллированной воды и 4,2 мл концентрированной соляной

кислоты. Колбы закрывают ватными пробками и автоклавируют при 1 атм. в течение 20 минут. После охлаждения объем вытяжки доводят до 100 мл и после перемешивания раствор фильтруют. Берут 5—20 мл фильтрата (в зависимости от предполагаемой активности образца), переносят в мерную колбу на 100 мл, добавляют 40—50 мл дистиллированной воды и нейтрализуют раствор щелочью до pH 6,8 (вначале прибавляют 5 н. раствора NaOH, а затем 0,5 н. NaOH). После доведения объема жидкости до метки образец готов для анализа. Конечный раствор должен содержать приблизительно 0,1—0,2 мкг никотиновой кислоты в 1 мл.

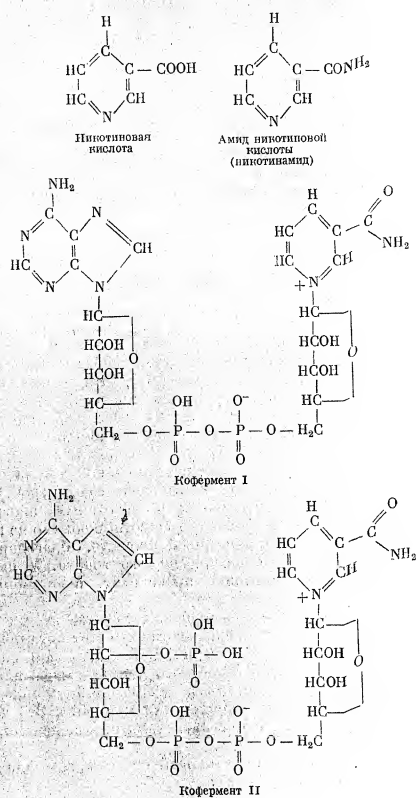
Материалы, содержащие большое количество жира, необходимо предварительно обезжиривать экстракцией серным эфиром.

II. Приготовление растворов для основной среды

1. Казеиновый гидролизат. 100 г казеина смешивают в литровой колбе с 500 мл 20%-ной соляной кислоты. Первые 5—8 час. смесь нагревают на водяной бане до растворения казеина, а затем на плитке с асбестовой сеткой. Из полученного гидролизата при пониженном давлении отгоняют HCl, к остатку добавляют 300 мл дистиллированной воды и снова отгоняют до густоты сиропа. Указанную операцию повторяют еще раз. Растворяют оставшуюся массу приблизительно в 100 мл дистиллированной воды, доводят pH до 3,5, добавляя 5 н. NaOH; объем жидкости доводят водой до 1 л, добавляют 20 г активированного древесного угля для извлечения витаминов и встряхивают в течение одного часа; затем фильтруют с отсасыванием. Еще раз повторяют обработку углем и получают бесцветный или слабожелтый раствор, который разливают в колбы по 100 мл и стерилизуют в автоклаве при 1 атм. в течение 20 минут. Можно также раствор не стерилизовать, а сохранять в холодильнике под слоем толуола.

2. Раствор d1-триптофана. 1 г d1-триптофана растворяют в 30—40 мл 10%-ной HCl, доводят водой до 200 мл и сохраняют в холодильнике под слоем толуола.

3. Раствор l-цистина. Отвешивают 1 г l-цистина, растворяют в 40 мл 10%-ной HCl и добавляют дистиллированной воды до 200 мл. Сохраняют в тех же условиях, как и раствор триптофана.



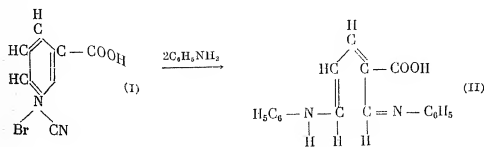
Наиболее важные свойства никотиновой кислоты и ее амида приведены в табл. 1.

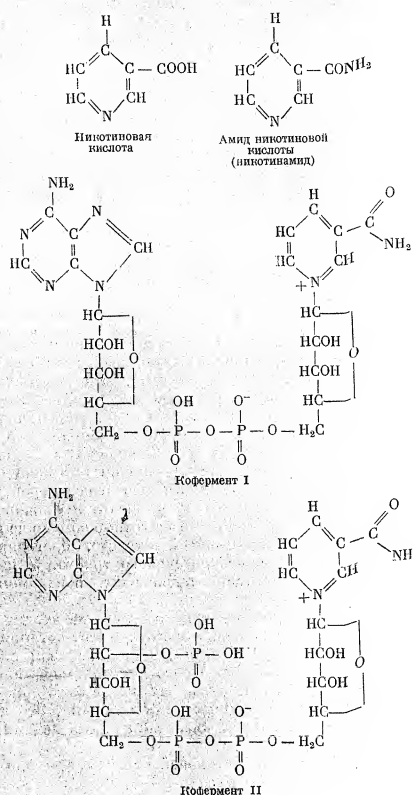
Та

Свойства никотиновой кислоты и никотинамида

Свойства	Никотиновая кислота	Никотинамид
Внешний вид	Бесцветные иголки	Бесцветные иголки
Вкус	Кислый	Горький
Эмпирическая формула	$C_6H_5O_2N$	$C_6H_6ON_2$
Молекулярный вес	123,11	122,12
Точка плавления	235,5—236,5°	128—131°
Точка кипения	Возгоняется	150—160° при 5×10^{-4} мм
Гигроскопичность	Негигроскопична	Слегка гигроскопична
Максимум абсорбции	385 мμ	212 мμ
pH 1%-ного раствора	3,0	6,0
Растворимость в:		
воде при 25°	1,67 г в 100 мл	100 г в 100 мл
спирте этиловом	0,73 г в 100 мл	66,6 г в 100 мл
сервом эфире	Нерастворима	Слегка растворима
глицерине при 25°		10 г в 100 мл

Никотиновая кислота и ее амид устойчивы к температуре, свету, pH и окислителям. Никотиновая кислота реагирует с диангидным бромом; образующееся при этом пиридиновое соединение (формула I) вступает в реакцию с ароматическими аминами (например, анилином и др.), давая окрашенный продукт (формула II).





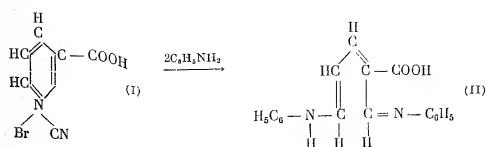
Наиболее важные свойства пикотиновой кислоты и ее амиды приведены в табл. 1.

Таблица 1

Свойства никотиновой кислоты и никотинамида

Свойства	Никотиновая кислота	Никотинамид
Внешний вид	Бесцветные иголки	Бесцветные иголки
Вкус	Кислый	Горький
Эмпирическая формула	$C_6H_5O_2N$	$C_6H_6ON_2$
Молекулярный вес	123,14	122,12
Точка плавления	235,5—236,5°	128—132°
Точка кипения	Возгоняется	150—160° при 5×10^{-4} мм
Гигроскопичность	Негигроскопична	Слегка гигроскопична
Максимум абсорбции	385 мμ	212 мμ
pH 1%-ного раствора	3,0	6,0
Растворимость в: воде при 25°	1,67 г в 100 мл	100 г в 100 мл
спирте этиловом	0,73 г в 100 мл	66,6 г в 100 мл
сервом эфире	Нерастворима	Слегка растворим
глицерине при 25°		10 г в 100 мл

Никотиновая кислота и ее амид устойчивы к температуре, свету, pH и окислителям. Никотиновая кислота реагирует с дианилиновым бромом; образующиеся при этом пиридиновые анионы (формула I) вступают в реакцию с ароматическими аминами (например, анилином, анилином и др.), давая окрашенный продукт (формула II).



Для хорошего разделения пятен необходимо выдерживать хроматограмму в камере в течение 15 час. как при нисходящем, так и при восходящем токе растворителя. Вследствие ярко выраженной зеленой флуоресценции рибофлавина и его нуклеотидов, нет необходимости в каком-либо проявлении хроматограмм; они непосредственно просматриваются в ультрафиолетовом свете. Для этой цели мы использовали обычный флуороскоп с кварцевой лампой и фиолетовым светофильтром.

Для подобранных нами условий (крабовая бумага, растворитель н-бутанол + уксусная кислота + вода, время разгонки 15 час. при температуре 23—24°) найдены следующие значения R_f для разных форм рибофлавина

	Восходящая хроматограмма	Нисходящая хроматограмма
Свободный рибофлавин	0,27—0,30	0,33
Рибофлавин-фосфат	0,11	0,11
Флави-динуклеотид*	0,06	0,045

Подобранные нами условия были использованы для хроматографического разделения рибофлавиновых соединений из животных тканей. Извлечение рибофлавина и его соединений из животных тканей производят тщательным растиранием навески ткани (0,5—1 г) с 10-кратным количеством фосфатного буфера pH 7,8—8. Смесь выдерживают в течение 45 мин. в кипящей водяной бане, охлаждают и добавляют либо трипсин, либо пептиновый ферментный препарат кларазу (50 мг на 1 г сухого вещества) и ставят в термостат на 12 час. при температуре 38°. Смесь отфильтровывают, в фильтрат добавляют сернокислый аммоний до половинного насыщения и обрабатывают фенолом, предварительно насыщенным водой.

Обработку смеси фенолом проводят в делительной воронке: берут такое количество фенола, чтобы после 3—4-кратной экстракции общий его объем равнялся 0,1 объема вытяжки, доведенной до половинного насыщения сернокислым аммонием; при этом рибофлавин и его нуклеотиды переходят в фенол. К фенольному экстракту добавляют 7 объемов серного эфира и 1—2 мл воды, смесь встряхивают, в результате чего флави-

* Данные R_f для флави-динуклеотида получены при хроматографическом разделении форм рибофлавина в вытяжках из печени кролика и грудной мышцы голубя.

и его нуклеотиды переходят в воду. Водную вытяжку обрабатывают еще раз одним объемом эфира для удаления следов фенола и полученную вытяжку используют для хроматографии.

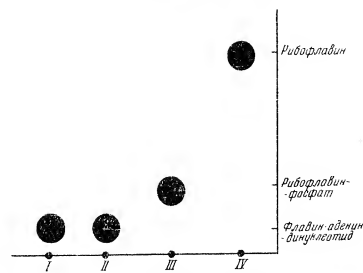


Рис. 1. Хроматограммы на бумаге вытяжек: I — из грудной мышцы голубя, II — из печени кролика, III — рибофлавин-фосфат, IV — рибофлавин

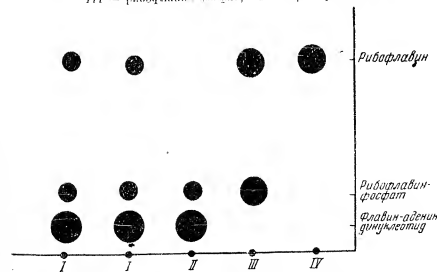


Рис. 2. Хроматограмма на бумаге вытяжек, после 48 час. настаивания: I — из грудной мышцы голубя, II — из печени кролика, III — рибофлавин-фосфат, IV — рибофлавин

Обработку вытяжки фенолом следует проводить как можно быстрее, иначе флави-адениндинуклеотид разрушается до флави-монопнуклеотида. Количество вытяжки, наносимое на

удовлетворительных данных необходимо, чтобы по крайней мере 3, а лучше 5 точек, представляющих собой результаты титрования опытных вытяжек, уложились в пределах стандартной кривой.

При наличии нефелометра возможно проводить определение не путем титрования молочной кислоты, а по мутности среды. Сопоставление стандартных кривых, полученных обоими методами, дано на рис. 2.

Однако мы отдаем предпочтение титрометрическому методу, так как окраска и непрозрачность опытных вытяжек в некоторых случаях могут сказаться на точности определений, если вести их по мутности. Кроме того, бактерии образуют иногда колонии в виде комочков, что снижает общую мутность растворов.

Приведенный метод достаточно прост, доступен и может легко применяться в тех лабораториях, которые не располагают флуорометром. Помимо этого, микробиологический метод должен быть использован при получении синтетических препаратов рибофлавина по новой схеме производства, при испытании новых способов перекристаллизации и при установлении новых форм рибофлавина в природных материалах для того, чтобы установить их биологическую активность.

В своей работе [3] по установлению существования прочно связанной с белком формы рибофлавина мы широко и с успехом применили микробиологический метод.

Литература

1. Снелл, Е. Микробиологические методы определения витаминов. — Об. Микробиологические методы определения витаминов и аминокислот, под ред. К. Л. Поволоцкой. Изд. ИЛ, 1954.
2. Поволоцкая К. Л. и Скоробогатова Е. П. Сопоставление химического и микробиологического методов определения рибофлавина в растительном материале. — Биохимия, 18, 79, 1953.
3. Поволоцкая К. Л. О новой связанной с белком форме рибофлавина. — Биохимия, 18, 635, 1953.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

К. Л. ПОВОЛОЦКАЯ и Н. И. ЗАЙЦЕВА

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД РАЗДЕЛЕНИЯ РИБОФЛАВИНА И ЕГО НУКЛЕОТИДОВ

В предыдущей работе [1] нами была показана возможность раздельного количественного определения различных форм рибофлавина флуорометрическим методом, однако при исследованиях нередко возникает необходимость в более точной идентификации состава рибофлавиновых компонентов, и в этом отношении метод распределительной хроматографии на бумаге имеет ряд преимуществ. При разработке методики были использованы данные, приведенные в работе Краммера [2], однако нам пришлось подобрать сорт бумаги отечественной марки, наилучшую смесь растворителей при работе с ней, а также способ очистки вытяжки перед хроматографированием.

Из четырех сортов испытанной хроматографической бумаги наиболее пригодной оказалась крабовая бумага Ленинградского завода.

Для проверки скорости прохождения рибофлавина и рибофлавин-фосфата, 0,0001 М растворы их наносились на бумагу как в отдельности, так и в смеси. Из растворителей были испытаны следующие смеси: бензиловый спирт с уксусной кислотой, н-бутиловый спирт с соляной кислотой, н-бутиловый спирт с уксусной кислотой, 5%-ный раствор двузамещенного фосфата натрия, смесь фенола с н-бутиловым спиртом, н-бутиловый спирт с раствором мочевины и другие, применяющиеся различными авторами [3].

В результате оказалось, что наиболее четкие хроматограммы на крабовой бумаге получаются при применении в качестве растворителя смеси из 4 объемов н-бутилового спирта, 2 объемов ледяной уксусной кислоты и 4 объемов воды. При большем количестве воды в смеси, рекомендуемом Краммером [2], в наших условиях получаются менее компактные пятна.

9 Витамины ресурсы

отфильтровывают, фильтрат проверяют на отсутствие следов PbS и его объем доводят до 1 л.

Раствор цистина. 4 г l-цистина суспендируют в 50 мл горячей воды, прибавляют по каплям концентрированную соляную кислоту до полного растворения цистина, доводят объем до 1 л водой.

Раствор неорганических солей готовят в двух отдельных колбах. Раствор А содержит в 250 мл 25 г K_2HPO_4 и 25 г KH_2PO_4 ; раствор В содержит в 250 мл 0,5 г $MgSO_4$, 0,5 г $NaCl$, 0,5 г $FeSO_4$ и 0,5 г $MnSO_4$.

Для приготовления основной среды на 50 пробирок ингредиенты берутся в следующих соотношениях: глюкозы — 5 г; раствора пептона — 50 мл; раствора цистина — 12,5 мл; дрожжевого экстракта — 10 мл; раствора солей А — 2,5 мл; раствора солей В — 2,5 мл; pH среды доводят 1 н. NaOH до 6,6—6,8 и объем смеси доводят до 250 мл. Концентрация полученной среды в 2 раза выше концентрации среды, на которую производят посев. Нужную концентрацию среды получают добавлением испытуемых вытяжек или воды.

Стандартный раствор рибофлавина (40 мкг в 1 мл) — тот же, что и при химических определениях; его разводят водой так, чтобы конечная концентрация раствора была равна 0,1 мкг в 1 мл.

Рабочий раствор готовят каждый раз перед постановкой опыта.

Подготовка образцов

Для определения рибофлавина в трех образцах необходимо иметь 45 обычных химических пробирок. Во все пробирки вносят по 5 мл основной среды. 18 пробирок служат для получения стандартной кривой, для этого в две пробирки добавляют по 5 мл воды (нулевая проба), в следующие пробирки вносят возрастающие количества рабочего раствора рибофлавина: 0,5; 1,0; 1,5; 2; 2,5; 3 и 5 мкг. Во всех пробирках объем жидкости доводят водой до 10 мл. Для каждой концентрации рибофлавина берут две пробирки. Таким образом получают стандартный ряд пробирок с концентрацией рибофлавина в 0,0; 0,005; 0,01; 0,015; 0,02; 0,025; 0,03 и 0,05 мкг в 1 мл.

Для опытного образца берут 10 пробирок и также вносят все возрастающие количества растительной вытяжки: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 и 5,0 мл. Объем жидкости доводят водой до 10 мл. Для каждой концентрации берут по две пробирки.

Все пробирки стерилизуют в автоклаве в течение 15—20 мин. при 1 атм и охлаждают до комнатной температуры. Затем в каждую пробирку вносят по 2 капли посевного материала, приготовленного, как указывалось выше, и помещают пробирки в термостат при 37° на 48 часов. После этого содержимое каждой пробирки выливают в колбочку, пробирку несколько раз

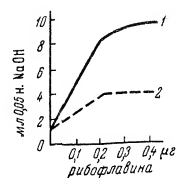


Рис. 1. Образование молочной кислоты при различных сроках выращивания культуры *Lactobacillus casei* — 48 часов (1) и 24 часа (2)

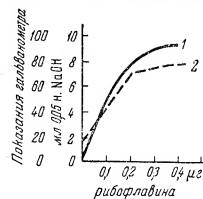


Рис. 2. Стандартные кривые для рибофлавина, полученные титрованием молочной кислоты (1) и определением мутности среды (2)

промывают водой, которую сливают в ту же колбочку, и образовавшуюся молочную кислоту титруют 0,1 н. NaOH с бромтимолблау в качестве индикатора.

Очень важно до начала опыта тщательно установить необходимую величину pH основной среды и испытуемых вытяжек, иначе могут быть получены неправильные результаты. Обычно на титрование нулевой пробы должно пойти не более 1,0—1,5 мл 0,1 н. NaOH. На титрование пробирок с высшими концентрациями рибофлавина (0,025—0,03 мкг) должно быть использовано около 10—12 мл NaOH (рис. 1). Результаты титрования параллельных проб не должны расходиться больше чем на 0,2 мл. По данным титрования опытных пробирок находят содержание в них рибофлавина путем простой интерполяции стандартной кривой. Результаты, выходящие за пределы стандартной кривой (0,005 и 0,025 мкг на 1 мл), отбрасывают; полученные величины сравнивают для того, чтобы убедиться, сходятся ли они при различных разбавлениях испытуемого образца. Если максимум отклонений не превышает 20%, из всех величин выводят среднее. Для получения

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАТИОНИТА СДВ-3 ПРИ ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКОМ МЕТОДЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА В₁

А. А. ДМИТРОВСКИЙ

Флуориметрический метод определения витамина В₁ является точным, чувствительным, быстрым и потому наиболее распространенным [1, 2, 3, 4]. Основное препятствие для еще более широкого использования этого метода — это дефицитность адсорбента декальсо, искусственного алюмосиликата, с помощью которого отделяют мешающие определению примеси. Ввиду трудности стандартизации этого адсорбента при лабораторном изготовлении [5, 6], мы исследовали другие способы отделения мешающих при определении витамина В₁ примесей. Для этого испытывалось разрушение примесей путем нагревания вытяжек, подкисленных соляной кислотой до pH = 2, с последующей экстракцией примесей изобутиловым спиртом, как это описано Г. Д. Елисеевой [7]. С этой же целью мы применили способ распределительной экстракции по А. В. Труфанову и В. А. Кирсановой [8], для чего витамин В₁ экстрагировали из декальсо фенолом, а при добавлении серного эфира переводили в воду. Наконец, отделение примесей было испытано на силикате и природных адсорбентах, а также на катионитах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Опыты проводили с растворами чистого витамина В₁ и с вытяжками из, приготовленными по методу, принятому в нашей лаборатории [9]. Вытяжки получали кипячением 5 г материала с 75 мл 0,1 н. H₂SO₄ в течение 30 мин., к ним, после нейтрализации, для освобождения связанных форм витамина добавляли ферментный препарат. После выдерживания при 37° в течение

12 час. вытяжки отфильтровывали, доводили до объема 100 мл и подвергали дальнейшей обработке.

Освобождение от примесей по Елисеевой [7] и по Труфанову и Кирсановой [8]

При испытании данных способов в качестве объектов были взяты богатая примесями вытяжка из ржаных сухарей, полученная, как указано выше, и моча человека. Для освобождения от примесей вытяжку и мочу обрабатывали по Елисеевой или Труфанову и Кирсановой, делили на две части, к одной из них добавляли только щелочь, а ко второй, кроме того, феррицианид для окисления витамина В₁ в тioxром. Обе части обрабатывали изобутиловым спиртом, флуоресценцию тioxрома в изобутиловом спирте измеряли после отделения изобутилового спирта от воднощелочного слоя. Таким образом получали два отсчета гальванометра флуорометра — для раствора без окисления (указывает содержание примесей) и для раствора с окислением (примеси + тioxром).

Таким же образом испытывали для сравнения вытяжки, полученные с предварительной обработкой декальсо [9] и без всякой обработки; полученные результаты представлены в табл. 1.

В таблице первые цифры означают показания гальванометра для окисленных феррицианидом проб, вторые цифры — показания неокисленных проб, а разность между ними характеризует интенсивность флуоресценции, обусловленную витамином В₁. Для сопоставления следует сказать, что флуоресценция

Таблица 1

Сравнение эффективности отделения примесей различными методами

Наименование объекта исследования	Отсчеты по флуорометру		
	с обработкой		
	без обработки	декальсо	по Елисеевой по Труфанову и Кирсановой
Сухари ржаные	42—49=13	34—49=24	39—22=17 29—16=13
Моча	50—50=0	50—44=6	48—45=3 27—19=8

уксуснокислого натрия. Колбу закрывают ватной пробкой и выдерживают в термостате при 37° в течение 12—16 часов. Охладив раствор, доводят его объем до 50—100 мл дистиллированной водой, перемешивают, фильтруют и берут для адсорбции 10—20 мл вытяжки.

Далее ход определения свободного и общего тиамин а одинаков. Разница между обоими определениями даст величину связанного тиамин а (докарбоксилаза)¹.

Проведение адсорбции тиамин а. Для проведения адсорбции употребляют длинную трубку (27 см), спаянную из трех трубок различного диаметра: первая — длиной 9 см, диаметром 2,5 см; вторая, средняя — длиной 15 см, диаметром 0,7 см; третья, нижняя трубочка капиллярная — длиной 3 см, диаметр капилляра 1 мм (см. рис. 2).

В нижнюю часть второй трубки помещают комочек стеклинной ваты таким образом, чтобы полочка лежала поперек отверстия, и вставляют столбик адсорбента высотой 6 см в случае применения «декальсо». При использовании других адсорбентов высота столбика может быть больше или меньше и зависит от адсорбционных свойств адсорбента. Столбик адсорбента промывают 10 мл 3%-ной уксусной кислоты, после чего в трубку вводят от 10 до 20 мл исследуемой вытяжки. После того как вся жидкость прошла через адсорбент, его промывают трехкратным пропусканием дистиллированной воды (каждый раз по 10 мл).

Тиамин с адсорбента элюируют горячим 25%-ным раствором KCl в 0,1 н. HCl. Жидкость собирают в градуированный цилиндр до тех пор, пока ее объем не будет равным 25 мл.

Получение тнохрома. По 5 мл полученного раствора помещают в две маленькие цилиндрические делительные вороночки, и первую прибавляют 3 мл смеси 0,04%-ного раствора феррицианида в 15%-ном растворе NaOH, перемешивают и прибавляют 12 мл изобутилового или изомиллового спирта. Во вторую делительную воронку, служащую контрольной, прибавляют 3 мл 15%-ного раствора NaOH (без феррицианида), перемешивают и прибавляют 12 мл изобутилового спирта.

¹ Приготовленные указанными выше способами вытяжки могут быть использованы для определения рибофлавина, при этом в вытяжке без фермента определяют свободный и монофосфорный рибофлавин, а в вытяжке с ферментом суммарно — флавин-эдин-диуксусат, моноуксусат и свободный рибофлавин (прочно связанный с белком рибофлавин определяется не будет). Подробно о методе определения рибофлавина см. в статье К. А. Новикова, Н. П. Зайцевой и Е. П. Скоробогатовой, помещаемой ниже [5].

Обе вороночки встряхивают в течение 1,5 мин. После отстаивания сливают нижний водный слой и отбрасывают его. В изобутиловый спирт добавляют около 2 г Na₂SO₄, встряхивают и просветленный раствор употребляют для флуорометрии. Этот раствор должен быть совершенно прозрачным, в противном случае следует добавить Na₂SO₄, дать постоять, слить раствор и перенести в кювету. Параллельно проводят окисление стандартного раствора тиамин а, для чего в две делительные вороночки берут по 1 мл рабочего раствора тиамин а, содержащего 1 мкг этого витамина, добавляют по 4 мл воды и в одну вносят щелочной раствор феррицианида, а во вторую — щелочной раствор без феррицианида, производят окисление тиамин а и извлечение тнохрома, как описано выше.

Флуорометрия. Для количественного определения тнохрома используют флуорометр, снабженный чувствительным гальванометром, специфическим светофильтром с максимумом поглощения около 390 мμ и одинаковыми пробирками или кюветами из нефлуоресцирующего стекла¹.

В каждую из взятых пробирок (или кювет) помещают около 8 мл испытуемых окисленных и неокисленных изобутиловых растворов, а также изобутиловые растворы окисленного и неокисленного стандартного раствора тиамин а и производят определение интенсивности флуоресценции по шкале гальванометра.

Расчет производят по следующей формуле:

$$\frac{(x-y) \cdot 1 \cdot x \cdot 25}{(x_1-y_1) \cdot p \cdot v_1 \cdot 5} = \text{мкг тиамин а в 1 г образца, где:}$$

x — показания флуорометра для испытуемого образца с окислителем;

y — показания флуорометра для испытуемого образца без окислителя;

x_1 — показания флуорометра для стандартного раствора с окислителем;

y_1 — показания флуорометра для стандартного раствора без окислителя;

1 — 1 мкг тиамин а в 12 мл изобутилового спирта;

p — навеска образца (в г);

v — объем (в мл), до которого была доведена опытная смесь после кислотного или щелочного и ферментативного гидролиза;

¹ В случае отсутствия флуорометра определение можно производить визуально в ультрафиолетовом свете, дозируя опытные вытяжки раствором тнохрома до флуоресценции стандартного раствора окисленного тиамин а (подробно см. Мурри [2]).

Таблица 1

Содержание тиамина в различных образцах при его определении с применением адсорбции и без нее (в $\mu\text{г}$ на 1 г материала естественной влажности)

Исследуемый материал	Показания гальванометра флуорометра				Содержание тиамина		Процентное соотношение со- держания тиамина при со- единении с адсорбцией к его содержанию, определен- ному без адсорбции
	без адсорбции		с адсорбцией		без адсорбции	с адсорбцией	
	опытный вытяжка	исходный вытяжка	опытная вытяжка	исходная вытяжка			
Пшеница (зерно)	57	7	5	6	4,7	5,3	112
Хлеб пшеницы (сухари) .	37	33	32	13	0,35	2,40	800
Пшеница 1 семя	27	7	36	4	1,6	3,77	235
Фасоль 1 семя	45	36	18	7	1,34	2,11	137
Хлопчатник (проростки)	12	9	12	5	0,28	0,82	292
Картофель (клубни) . .	12	11,5	12	6,5	0,06	0,65	1100
» (сердечника)	21	7	13	8,0	1,10	1,06	96

рабочего раствора 1 мл стандартного раствора доводят водой до 100 мл; готовят рабочий раствор в день определения. Такой раствор содержит 1 $\mu\text{г}$ тиамина в 1 мл.

2) 0,1 н. H_2SO_4 .

3) 2,5 М раствор уксуснокислого натрия. Растворяют 340 г CH_3COONa в 1 л воды.

4) 25%-ный раствор хлористого калия. Растворяют 250 г KCl в воде, добавляют 8,5 мл концентрированной HCl и объем доводят до 1 л.

5) 25%-ный раствор хлористого калия в воде (для обработки адсорбента).

6) 15%-ный раствор NaOH .

7) 1%-ный раствор $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ готовят в день употребления. Для окисления вытяжек используют 0,04%-ный раствор $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ в 15%-ном растворе NaOH , для чего 4 мл исходного раствора вносят в 96 мл 15%-ного раствора NaOH . Щелочной раствор $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ годен для употребления в течение 4 час. после приготовления.

8) Сернокислый натрий безводный.

9) Ледяная уксусная кислота, разводит до концентрации 3%.

10) Адсорбент типа пермтита. Пермтит кипятят 15 мин. с десятикратным количеством 3%-ной уксусной кислоты¹.

11) Изобутиловый или изомасляный спирт. Необходимо проверить спирт на отсутствие флуоресценции (допустимо отклонение стрелки гальванометра флуорометра не более чем на 4—5 делений). Если спирт флуоресцирует, его следует перегнать в приборе со стеклинными шлифами. Если после перегонки флуоресценция не исчезает, следует его обработать 10—30 г активированного угля на 1 л спирта и вновь перегнать (не допускается использование резиновых пробок).

Ферментные препараты: клараза (патентованный ферментный препарат) или ферментный препарат из мицелия *Penicillium*. Мицелий, отжатый от лишней влаги лабораторным прессом до содержания 25—30% сухих веществ, высушивают при температуре не выше 45°. Мякно растирают и хранят в сухом и темном месте. Перед внесением в вытяжку следует ферментный препарат растереть в ступке с небольшим количеством раствора уксуснокислого натрия. Рекомендуется проводить определение количества тиамина в ферментных препаратах из, если оно превышает 0,1 $\mu\text{г}$ на 1 г препарата, вычитать из найденного тиамина то его количество, которое внесено с ферментным препаратом. Обычно этого не приходится делать, так как содержание тиамина в препаратах не превышает указанной величины.

Подготовка образцов. 5—10 г образца помещают в ступку с небольшим количеством 0,1 н. H_2SO_4 и тщательно растирают. Раствертую массу переносят в колбу, добавляя 0,1 н. H_2SO_4 так, чтобы общий объем кислоты был равен 40—70 мл. Колбу помещают на водяную баню и часто встряхивают, чтобы образец не пристал к стенкам колбы. Экстракцию ведут 45 минут. Затем колбу охлаждают до 50°, добавляя 2,5 М раствор уксуснокислого натрия до pH 4,5—5,0.

При определении свободного тиамина индикатор доводят до определенного объема, фильтруют и берут для адсорбции 10—20 мл вытяжки.

При определении общего содержания тиамина после доведения pH вытяжки до 4,5—5,0 добавляют ферментный препарат (30 мг на 1 г сухого вещества вытяжки пшеницы). Ферментный препарат следует предварительно растереть с раствором

¹ При проведении работы мы использовали импортный адсорбент «декальсон»; о возможности замены «декальсоном» отечественным адсорбентом см. статью А. А. Дмитриевского [1].

Таблица 1

Содержание тиамина в различных образцах при его определении с применением адсорбции и без нее (в $\mu\text{г}$ на 1 г материала естественной влажности)

Исследуемый материал	Поташания гальванометра флуорометра				Содержание тиамина		Прокцентное отношение содержания тиамина при его окислении к содержанию, определенному без адсорбции
	без адсорбции		с адсорбцией		без адсорбции	с адсорбцией	
	окисшенный выжимка	неокисшенный выжимка	окисшенный выжимка	неокисшенная выжимка			
Пшеница (зерно) . . .	57	7	5	6	4,7	5,3	142
Хлеб пшеницы (сухари) .	37	33	32	13	0,35	2,40	600
Ячмень . . .	27	7	36	4	1,6	3,77	235
Фасоль . . .	46	36	18	7	1,54	2,11	137
Хлопчатник (проростки) .	12	9	12	5	0,28	0,82	292
Картофель (кожура) . .	12	14,5	12	6,5	0,06	0,65	1100
» (сердцевина) . . .	21	7	13	8,0	1,10	1,06	96

рабочего раствора 1 мл стандартного раствора доводят водой до 100 мл; готовят рабочий раствор в день определения. Такой раствор содержит 1 $\mu\text{г}$ тиамина в 1 мл.

2) 0,1 н. H_2SO_4 .

3) 2,5 М раствор уксуснокислого натрия. Растворяют 340 г $\text{C}_2\text{H}_3\text{COONa}$ в 1 л воды.

4) 25%-ный раствор хлористого калия. Растворяют 250 г KCl в воде, добавляют 8,5 мл концентрированной HCl и объем доводят до 1 л.

5) 25%-ный раствор хлористого калия в воде (для обработки адсорбента).

6) 15%-ный раствор NaOH .

7) 1%-ный раствор $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ готовят в день употребления. Для окисления вытяжек используют 0,04%-ный раствор $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ в 15%-ном растворе NaOH , для чего 4 мл исходного раствора вносят в 96 мл 15%-ного раствора NaOH . Щелочной раствор $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ годен для употребления в течение 4 час. после приготовления.

8) Сернистокислый натрий безводный.

9) Медная уксусная кислота, разводят до концентрации 3%.

10) Адсорбент типа пермутита. Пермутит кипятят 15 мин. с десятикратным количеством 3%-ной уксусной кислоты¹.

11) Изобутиловый или изопропиловый спирт. Необходимо проверить спирт на отсутствие флуоресценции (допустимо отклонение стрелки гальванометра флуорометра не более чем на 4—5 делений). Если спирт флуоресцирует, его следует перегнать в приборе со стеклянными шлифами. Если после перегонки флуоресценция не исчезает, следует его обработать 10—30 г активированного угля на 1 л спирта и вновь перегнать (не допускается использование резиновых пробок).

Ферментные препараты: клараза (патентованный ферментный препарат) или ферментный препарат из мицелии *Penicillium*. Мицелий, отжатый от лишней влаги лабораторным прессом до содержания 25—30% сухих веществ, высушивают при температуре не выше 45°. Мелко растирают и хранят в сухом и темном месте. Перед внесением в вытяжку следует ферментный препарат растереть в ступке с небольшим количеством раствора уксуснокислого натрия. Рекомендуется проводить определение количества тиамина в ферментных препаратах и, если оно превосходит 0,1 $\mu\text{г}$ на 1 г препарата, вычитать из найденного тиамина то его количество, которое внесено с ферментным препаратом. Обычно этого не приходится делать, так как содержание тиамина в препаратах не превосходит указанной величины.

Подготовка образца. 5—10 г образца помещают в ступку с небольшим количеством 0,1 н. H_2SO_4 и тщательно растирают. Раствертую массу переносят в колбу, добавляют 0,1 н. H_2SO_4 так, чтобы общий объем кислоты был равен 40—70 мл. Колбу помещают на кипящую водяную баню и часто встряхивают, чтобы образец не пристал к стенкам колбы. Экстракцию ведут 45 минут. Затем колбу охлаждают до 50°, добавляют 2,5 М раствор уксуснокислого натрия до pH 4,5—5,0.

При определении свободного тиамина жидкость доводят до определенного объема, фильтруют и берут для адсорбции 10—20 мл вытяжки.

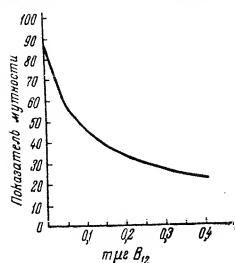
При определении общего содержания тиамина после доведения pH вытяжки до 4,5—5,0 добавляют ферментный препарат (30 мг на 1 г сухого вещества взятой навески). Ферментный препарат следует предварительно растереть с раствором

¹ При проведении работы мы использовали импортный адсорбент «декало»; о возможности замены «декало» отечественным адсорбентом см. статью А. А. Дмитриевского [1].

стандартную кривую. В среднем за неделю один сотрудник может провести две серии опытов, т. е. испытать 20—25 проб.

Учет интенсивности роста *B. coli*

После выдерживания пробирок в термостате содержимое каждой пробирки взбалтывают, затем заполняют кювету фотоэлектроколориметра ФЭК или нефелометра (результаты по фотоэлектроколориметру и нефелометру одинаковые) и измеряют мутность. При пользовании фотоэлектроколориметром отсчеты делают при синем свето-



Стандартная кривая при испытании растворов чистого витамина B₁₂ с *Bacterium coli*

фильтре. Средние значения мутности для каждой точки стандартного раствора витамина B₁₂ наносят по оси ординат, а по оси абсцисс откладывают цифры, соответствующие абсолютным количествам витамина B₁₂, содержащимся в каждой пробирке. Соединяют точки пересечения, вычерчивают стандартную кривую, образцом которой дается на прилагаемом рисунке. Содержание витамина B₁₂ определяют отдельно для каждой пробирки испытуемого образца путем интерполяции, а именно — нахождения на стандартной кривой той точки, которая соответствует данной степени мутности и отсчета на оси абсцисс соответствующего количества витамина B₁₂. Те данные, которые не укладываются в стандартную кривую, отбрасывают. Из тех же, которые уложились, высчитывают количество витамина B₁₂ в исходном образце и берут среднюю величину не менее, чем из 3—4 параллельных. Если наблюдается рост микробов в контрольных пробирках с разрушенным витамином B₁₂, то его количество, соответствующее данному росту, высчитывают таким же образом, эту величину вычитают из ранее найденной величины содержания B₁₂. Как показал опыт работы, случался, когда надо было бы вводить поправку, очень редко.

В табл. 2 приведен пример определения витамина B₁₂ в печени рога-го скота.

Таблица 2

Пример определения витамина B₁₂ в печени рога-го скота (таблица 2-1, разведение 1:5000)

№ пробирки	Количество витамина, добавленной в пробирку в мг	Показатель мутности	Обнаружено витамина B ₁₂ (мкг)		
			в пробе	в 1 мл раствора	в 1 г печени
1	0,5	54	0,059	0,080	450
2	0,5	52	0,059	0,100	500
3	1,0	45	0,087	0,087	435
4	1,0	52,5	0,089	0,080	450
5	1,5	37	0,125	0,085	415
6	1,5	37	0,125	0,085	415
7	2	33	0,160	0,080	400
8	3	22	0,275	0,091	455
9	3	23	0,285	0,088	440
10	5	16	0,500	0,070	350

В среднем 432,5

При вычислении среднего значения содержания витамина B₁₂ в 1 г результаты, полученные во второй и десятой пробирках, были отброшены как далеко отстоящие от средней величины.

ВЫВОДЫ

1. Пользуясь специально выведенными штаммами *Bacterium coli*, дефектными в отношении биосинтеза витамина B₁₂, подобран и испытан микробиологический метод определения витамина. Для определения достаточно наличия 2—4 миллимикротраграммов (мкг) витамина B₁₂ во взятой навеске испытуемого образца.

Литература

- Shorb M. S. Unidentified growth factors for *Lactobacillus lactis* in refined liver extracts. — J. Biol. Chem., 169, 455, 1947.
- Райт Дж., Скоттс Дж., Рубин Г. и Де Риттер Дж. Микробиологические методы определения витаминов. Сб. статей «Микробиологические методы определения витаминов и аминокислот». Изд. ИЛ, 1954.
- Shorb M. S., King Y. T., Kao A., Scott W. M. Factors influencing the microbiological assay of Vitamin B₁₂. Characterization of a fraction having growth stimulating activity for *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus leichmannii* in the vitamin B₁₂ assay. Symposium sur la biochimie de l'hématopoïèse, Paris, 1952.
- Петров Д. Ф. и Глазовский Н. Г. Витамин B₁₂ в печени рога-го скота. — ДАН, т. XCV, № 2, 390, 1954.

Подготовка испытуемого образца для анализа

В природных материалах основная часть витамина B_{12} находится в связанном с белком виде и является микробиологически неактивной до тех пор, пока не будет разрушена эта связь путем автоклавирования, кипячения или протекания. Табл. 1 дает представление о степени освобождения витамина B_{12} при различного рода обработке материала.

Таблица 1

Содержание витамина B_{12} в печени, определяемое при различной обработке материала (в $\mu\text{г}$ на г сухого вещества)

Образец	Содержание витамина B_{12} при				
	выстигнции на хо- лоду	кипячение в течение 24 часов при 37°	кипячение в течение 24 часов при 47°	кипячение в течение 30 мин.	автоклавирование в течение 10 мин при 120°
Печень крупного рогатого скота	263	737	1070	1100	1130
То же	0	884	—	1150	1720
» »	150	620	1200	1160	1600
Печень кролика	—	—	600	570	360
» кролика	75	—	—	900	1000

Приводим ниже описание подготовки испытуемого образца путем автоклавирования.

1—2 г образца тщательно измельчают и суспендируют в 50 мл дистиллированной воды. Для лучшего отделения витамина B_{12} от белка, а также для его стабилизации, особенно некоторых его форм, например витамина B_{12a} (оксикобаламина), добавляют 200—400 $\mu\text{г}$ KCN, pH суспензии затем доводят до 5 добавлением 1—2 капель 1 н. HCl и суспензию автоклавировуют в течение 10 мин. при давлении в одну атмосферу.

После охлаждения содержимое переносит в 100 мл-мерную колбу, добавляют 0,5 н. раствор NaOH до pH 6,8 и воду до метки. Смесь фильтруют и часть фильтрата разводят до такой концентрации, чтобы в 1 мл было приблизительно 0,05—0,1 $\mu\text{г}$ витамина B_{12} . Если не известно даже приблизительно, каково содержание B_{12} в исследуемом образце, приходится разводить

смесь несколько раз и испытывать каждую из проб. Материалы, содержащие большое количество жира, следует предварительно обезжиривать путем экстракции серным эфиром (например, печень трески).

Приготовление контрольного образца

В испытуемом образце иногда могут содержаться значительные количества метионина или гистидина, к которым чувствительны применяемые нами штаммы. Поэтому необходимо проводить контрольное определение с опытной вытяжкой, в которой витамин B_{12} разрушен. Для этого 5 мл неразведенного фильтрата смешивают с 5 мл 0,2 н. NaOH и кипятят в течение 30 мин. с обратным холодильником. После охлаждения раствор нейтрализуют добавлением 1 н. раствора HCl и разводят до такой же степени, как и в опыте с неразрушенным витамином B_{12} .

Постановка опыта

Проведение опыта состоит из двух частей — получение стандартной кривой для чистого витамина B_{12} и испытание исследуемого образца.

В 27 широких пробирок одинакового размера (1,7×18 см) индикатор вносят по 5 мл опытной среды, различные количества разбавленного раствора витамина B_{12} (0—0,5—1,0—1,5—2,0—2,5—3,0—3,5—4 мл), затем добавляют воду в каждом случае до 10 мл. На каждую градацию витамина B_{12} в том числе и на опыт без витамина B_{12} , приходится по 3 пробирки.

При испытании исследуемого образца поступают точно таким же образом с той лишь разницей, что вместо стандартного раствора витамина B_{12} вносят те или иные количества опытной вытяжки. Обычно берут 10 пробирок по 2 пробирки на каждую повторность. Можно рекомендовать вносить следующие количества опытной вытяжки: 0,5—1,0—1,5—3,0—4 мл. Кроме того, ставят 3 пробирки с контрольной вытяжкой, в которой витамин B_{12} разрушен. В пробирки вносят 2, 3 и 4 мл этой вытяжки.

После разлива пробирки автоклавировуют 20 мин. при давлении 0,5 атм., охлаждают, засевают одной каплей бактериальной взвеси и ставят в термостат на 24 часа при 37°.

Опыт показал, что одновременно целесообразно ставить на испытание 10—12 образцов, имея для каждой серии

гистидину. Кроме того, в нашем распоряжении имелся штамм *Escherichia coli*, чувствительный к витамину B_{12} и метионину.

Чувствительность к метионину и гистидину у указанных штаммов выражена значительно слабее, чем к витамину B_{12} ; их действие может проявляться лишь при концентрациях, в несколько десятков тысяч раз превышающих таковые для B_{12} . Поэтому в практических условиях редко приходится прибегать к постановке контрольных опытов с разрушением витамина B_{12} (см. ниже). Эту предосторожность надо, однако, иметь в виду при испытании материалов с низким содержанием витамина B_{12} , когда приходится иметь дело с сравнительно мало разведенными вытяжками, в которых концентрация метионина может оказаться высокой.

Все три штамма имеют то большое преимущество, что они растут на простой минеральной среде с добавлением глюкозы и развиваются в два раза быстрее, чем *L. lactis* Doigne, что значительно упрощает и ускоряет всю работу.

Ниже приведено описание микробиологического метода определения витамина B_{12} , который был нами подобран и испытан на различного рода объектах.

Выращивание культуры

Культуру выращивают на скошенной агаровой среде и хранят в холодильнике. Раз в месяц культуру пересевает на свежую агаровую среду и после посева выдерживают 24 часа в термостате при 37° . Состав агаровой среды на 100 мл:

1. Казеиновый кислотный или ферментативный гидролизат (в расчете на сухое вещество) 0,6 г
2. Калий фосфорнокислый двузамещенный (K_2HPO_4) 20 мг
3. Железо сернокислотное ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) 0,5 "
4. Магний сернокислотный ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 20 "
5. L-аспарагин 20 "
6. Глицерин 200 "
7. Агар-агар 1,5 г
8. Витамин B_{12} 10 "

Составные части 1—4 растворяют последовательно в дистиллированной воде. Аспарагин растворяют отдельно с прибавлением нескольких капель 1 н. HCl при слабом подогревании и затем приливают к вышеуказанному раствору, pH доводят до 7,0, добавляют глицерин, агар-агар и воду до 100 мл. После подогревания на водяной бане до растворения агара вносят витамин B_{12} , смесь тщательно перемешивают, разливают в

пробирки по 5 мл и стерилизуют в автоклаве в течение 15 мин. при давлении в одну атмосферу.

Приготовление опытной среды

Состав опытной среды на 1 л:

Калий фосфорнокислый двузамещенный K_2HPO_4	7 г
Калий фосфорнокислый однозамещенный KH_2PO_4	3 "
Натрий лимоннокислый $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 5H_2O$	0,5 "
Магний сернокислый $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 "
Аммоний сернокислый $(NH_4)_2SO_4$	1,0 "
Глюкоза	2 "
Натрий хлористый (NaCl)	0,5 "
Калий цианистый (KCN)	1 мг

Ингредиенты растворяют последовательно в дистиллированной воде. Цианистый калий добавляют в виде раствора, в 1 мл которого содержится 0,05—0,1 мг. Конечное значение pH среды должно лежать в пределах 6,8—7,0.

Приготовление посевного материала

За сутки до засева опытных пробирок готовят посевной материал. Для этого в две пробирки берут по 5 мл указанной выше среды и 5 мл стандартного раствора витамина B_{12} , используемого для получения стандартной кривой (см. ниже). В 4 мл такого раствора содержится 0,0001 мг витамина B_{12} . Смесь автоклавируют при давлении 0,5 атм в течение 20 мин. и по охлаждению засевают культурой с агара. Засеянные пробирки ставят в термостат при 37° на 20—24 часа. Затем бактериальную суспензию переносят в стерильные центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 10 мин. (при 2500 об/мин.). Жидкость сливают, к осадку добавляют 10 мл 0,9%-ного раствора NaCl и клетки вновь отделяют центрифугированием. Осадок суспендируют в 30—50 мл 0,9%-ного раствора NaCl и используют для засева опытных пробирок, причем вносят по одной капле на пробирку.

Приготовление стандартного раствора витамина B_{12}

Для получения калибровочной кривой используют водный раствор витамина B_{12} , в 1 мл которого содержится 0,01 мг. Раствор хранят в холодильнике в склянке с притертой пробкой под слоем толуола. В день опыта делают второе разведение до содержания 0,0001 мг витамина B_{12} в 1 мл (в 100 раз).

Литература

1. Спелл Э. Микробиологические методы количественного определения витаминов. Сб. статей «Микробиологические методы определения витаминов и аминокислот». ИЛ, 1954.
2. Stokstad E. L. R. a. Hutchings B. L. The microbiological assay of *Lactobacillus casei* factor (vitamin B₁₂, folic acid). Biological symposia, v. XII, 1947.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Л. С. КУЦЕВА

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ВИТАМИНА B₁₂

Как известно, до 1947 г. не было других методов определения активности печеночных препаратов, применяемых при лечении пернициозной анемии, кроме их испытания на самих больных, что в сильной мере тормозило развитие работ в данной области. Лишь с установлением того факта (Шорб, 1947) [1], что для развития *Lactobacillus lactis* Dorner необходим какой-то неидентифицированный термостабильный фактор, присутствующий в указанных препаратах, а рост бактерий находится почти в прямой зависимости от степени их активности, был достигнут быстрый успех как в выделении действующего начала, получившего название витамина B₁₂, так и в разработке других сторон вопроса.

Наибольшее распространение при определении витамина B₁₂ получили *L. lactis* Dorner, *L. leichmanii*, *Escherichia coli* и высоко чувствительная и специфичная асептическая подорожка *Euglena gracilis* var. *bacillaris*. Специальная литература по микробиологическим методам определения витамина B₁₂ имеется в работах Райт и др. [2], Шорб и др. [3].

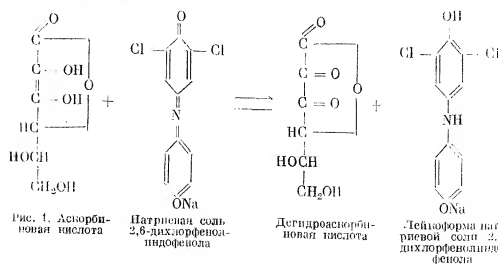
Свою работу мы начали с определения витамина B₁₂ микробиологическим методом, используя при этом *L. lactis* Dorner, и убедились в пригодности данной культуры и довольно хорошей воспроизводимости результатов. Однако сажать среды (требуется до 20 индикаторов, в том числе все витамины группы B, аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания) и громоздкость постоянных опытов побуждали нас искать другую культуру.

Мы получили от Д. Ф. Петрова два выделенных им штамма *Bacterium coli*, отзывавшиеся на B₁₂ [4]. Один из этих штаммов (П-3) чувствителен также к метионину, который может заменить для него витамин B₁₂, а второй штамм (П-4) —

ПРИЛОЖЕНИЕ

ХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ВИТАМИНА С)

Метод определения аскорбиновой кислоты основан на ее способности обратимо окисляться и восстанавливаться, благодаря наличию в ее молекуле эндиольной группировки. Специфичным индикатором для определения аскорбиновой кислоты является 2,6-дихлорфенолиндофенол, соединение, обладающее двойным изменением окраски, с одной стороны, при изменении pH среды от щелочной к кислой цвет раствора индикатора меняется от интенсивно синего до яркорозового, с другой, окисщенное соединение имеет окраску, а восстановленное — бесцветно. Строение аскорбиновой кислоты, 2,6-дихлорфенолиндофенола и их взаимные превращения представлены ниже.



Ниже приводится подробное описание методики определения аскорбиновой кислоты, которая может быть применена к большинству растительных и животных тканей. При анализировании окрашенных объектов или объектов, содержащих заметные количества обратимо-окисленной формы аскорбиновой кислоты (обычно объекты, подвергавшиеся той или иной переработке), следует применять ртутьно-сероводородный метод В. П. Буккина [1] или свинцово-сероводородный метод В. А. Девяткина и В. М. Попиковой [2].

Химический метод определения аскорбиновой кислоты 189

Первый метод является более точным по сравнению с методом Девяткина, и вытяжки, поступающие на титрование, всегда совершенно бесцветны и прозрачны. Метод Девяткина имеет преимущество перед ртутьно-сероводородным в том, что не применяются ядовитые вещества (сусема и уксуснокислая ртуть), но вытяжки бывают иногда не полностью обезврежены и всегда имеют некоторую опалесценцию.

Необходимые реактивы

- 1) 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола. Навеску 0,3 г 2,6-дихлорфенолиндофенола растворяют в 700 мл дистиллированной воды с добавлением 4–2 каплей 0,1 н. NaOH, сильно взбалтывают и оставляют на 1–2 часа (лучше на ночь), встряхивая время от времени. Затем фильтруют и доводят объем до 1 литра. Раствор может быть использован в течение периода до 7–14 дней при хранении в темноте и на холоду.
- 2) 1%-ная соляная кислота (23 мл концентрированной HCl с удельным весом 1,19 доводит дистиллированной водой до 1 л).
- 3) 2%-ная метафосфорная кислота (20 г кристаллической HPO_3 растворяют и доводят водой до 1 л).
- 4) 2%-ная серная кислота (11,4 мл концентрированной H_2SO_4 с удельным весом 1,84 доводит до 1 л).
- 5) Аскорбиновая кислота — кристаллическая.
- 6) 0,001 н. раствор подата калия (KJO_3). Отвешивают на аналитических весах 0,3568 г подата, предварительно высушенного в течение 2 часов при 104° , растворяют в воде и доводят объем до 1 л. Такой раствор является 0,01 н. В день определения титра его разбавляют в 10 раз, для чего берут 10 мл исходного раствора и доводят в мерной колбе до 100 мл дистиллированной водой. Исходный раствор устойчив и в течение нескольких месяцев при хранении в темноте.
- 7) Иодистый калий кристаллический (KI).
- 8) 1%-ный раствор растворимого крахмала.

Навеску материала, величина которой обуславливается содержанием аскорбиновой кислоты в исследуемом объекте, заливают необходимым количеством 1%-ной HCl так, чтобы вся навеска была покрыта кислотой. Навеску берут из расчета, чтобы в 5 мл предназначенной для титрования вытяжки содержалось 0,15–0,20 мг аскорбиновой кислоты. При взятии навески следует избегать измешивающих прикосновений из лавсена и меди. Навеску тщательно растворяют с кварцевым крахмалом в фарфоровой ступке. Добавляют соляную кислоту и навеску переносят в мерную колбу на 100 мл. Затем в колбу добавляют 2%-ную метафосфорную кислоту из расчета 1/3 от общего объема и доводят до метки 1%-ной HCl. Метафосфорную кислоту добавляют для удаления безазов и обезжелезивания фильтрата (для животных тканей следует применять 20%-ную трихлоруксусную кислоту и тот же растворитель).

вавшийся дицианидный комплекс витамина экстрагируют 4—5 раз малыми порциями (по 2—3 мл) бензилового спирта до прекращения окрашивания очередной его порции. Бензиловый экстракт промывают небольшими порциями насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (по 3—4 мл) до получения бесцветного промывного раствора. После этого к бензиловому экстракту добавляют равный объем хлороформа и витамин B_{12} экстрагируют небольшими порциями (по 2—3 мл 3—4 раза) воды.

Соединенные водные экстракты освобождают от следов бензилового спирта и хлороформа промыванием серным эфиром (2 раза по 4—5 мл), остатки которого удаляют из водного раствора пропусканием через него воздуха или осторожным догреванием на водяной бане. Раствор слегка подкисляют (уксусной кислотой для перевода дицианидного комплекса фиолетово-красное окрашивание) в цианкобаламине (чистый розовый цвет без фиолетового оттенка) и используют для колориметрирования.

Прем очистки витамина экстракцией B_{12} бензиловым спиртом в виде дицианидного комплекса и затем водой может быть заменен фенол-хлороформенной очисткой следующим образом.

Кислый водный экстракт, полученный после извлечения витамина B_{12} из бутилового спирта водой, экстрагируют малыми порциями смеси фенола и хлороформа (1:5) до прекращения окрашивания очередной ее порции (3—5 раз). Фенол-хлороформенные вытяжки соединяют и дважды промывают водой, насыщенной хлороформом. Для перевода витамина B_{12} в водную фазу к фенол-хлороформенной вытяжке добавляют 3-кратный объем хлороформа и витамин B_{12} извлекают малыми порциями воды до прекращения окрашивания очередной порции воды. Водные вытяжки соединяют и промывают серным эфиром для удаления остатков фенола и хлороформа как указано выше.

Полученные тем или иным способом водные экстракты должны иметь характерную для витамина B_{12} розовую окраску. Количество витамина B_{12} определяют спектрофотометрически по измерению поглощения при 548 м μ , пользуясь киватой толщиной в 1 см, и проводят расчет по формуле:

$$x = \frac{E \cdot V \cdot 10^4}{63},$$

где

x — содержание B_{12} в навеске в микрограммах;

E — наблюдаемый коэффициент поглощения;

V — объем конечного раствора, в мл;

63 — коэффициент поглощения 1%-ного раствора витамина B_{12} , т. е. при содержании 10000 микрограммов витамина в 1 мл;

10^4 — коэффициент пересчета концентрации витамина B_{12} с процентного содержания на число микрограммов в 1 мл.

При отсутствии спектрофотометра можно пользоваться колориметром, откалиброванным по растворам кристаллического витамина B_{12} с известным его содержанием.

При измерении пользуются зеленым светофильтром.

В заключение следует отметить, что для уверенности в пригодности метода для исследуемого материала, следует рекомендовать его проверку путем определения количества витамина, добавленного к материалу. При работе с печенью, уншем и культуральными жидкостями нам удалось определить не менее 90—95% добавленного витамина. Количество добавленного витамина составило 30—50% от его содержания в анализируемом материале.

ВЫВОДЫ

1. Разработан сравнительно простой химический метод определения витамина B_{12} , позволяющий вести испытания при наличии не менее 50—75 мкг витамина во взятой навеске материала.

2. Метод основан на экстракции витамина водным раствором нитрита натрия, очистке водных экстрактов от мешающих примесей и спектрофотометрическом или колориметрическом определении витамина в очищенной вытяжке.

Литература

1. Boxer G. E., Rickards J. C. Chemical determination of vitamin B_{12} . I. Determination of 5,6-dimethylbenzimidazole by colorimetric and fluorometric methods.—Arch. of biochem., 29, (4), 75 (1950).
2. Fanthes K. H. a. Ireland D. M. A colorimetric assay method for vitamin B_{12} .—Biochem. J., 46, proc. XXXIV (1950).
3. Boxer G. E. a. Rickards J. C. Chemical determination of vitamin B_{12} . II. The quantitative isolation and colorimetric determination of millimicrogram quantities of cyanide. — Arch. biochem., 30, (2), 372 (1951).
4. Boxer G. E. a. Rickards J. C. Chemical determination of vitamin B_{12} . V. A modified procedure for the determination of cobalamins in liver concentrates.—Arch. biochem. a. biophys., 39(2), 281 (1952).
5. Rudkin G. O. a. Taylor R. J. Chemical method for determining vitamin B_{12} .—Analyt. chem., 24, 1155 (1952).
6. Вукан В. Н., Арешкина Л. Я., Блюхмина Л. С. Микро- и макрометодика определения витамина B_{12} . Биохимия, 49, вып. 6, 713, 1954.

навшийся дицианидный комплекс витамина экстрагируют 4—5 раз малыми порциями (по 2—3 мл) безводного спирта до прекращения окрашивания очередной его порции. Бензиловый экстракт промывают небольшими порциями насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (по 3—4 мл) до получения бесцветного промывного раствора. После этого к бензиловому экстракту добавляют равный объем хлороформа и витамин B_{12} экстрагируют небольшими порциями (по 2—3 мл 3—4 раза) воды.

Соединенные водные экстракты освобождают от следов бензилового спирта и хлороформа промыванием серным эфиром (2 раза по 4—5 мл), остатки которого удаляют из водного раствора пропусканием через него воздуха или осторожным подогреванием на водяной бане. Раствор слегка подкисляют (уксусной кислотой для перевода дицианидного комплекса фиолетово-красное окрашивание) в цианокобаламин (чистый розовый цвет без фиолетового оттенка) и используют для колориметрирования.

Прием очистки витамина экстракцией B_{12} бензиловым спиртом в виде дицианидного комплекса и затем водой может быть заменен фенол-хлороформенной очисткой следующим образом.

Кислый водный экстракт, полученный после извлечения витамина B_{12} из бутилового спирта водой, экстрагируют малыми порциями смеси фенола и хлороформа (1:5) до прекращения окрашивания очередной ее порции (3—5 раз). Фенол-хлороформенные вытяжки соединяют и дважды промывают водой, насыщенной хлороформом. Для перевода витамина B_{12} в водную фазу к фенол-хлороформенной вытяжке добавляют 3-кратный объем хлороформа и витамин B_{12} извлекают малыми порциями воды до прекращения окрашивания очередной порции воды. Водные вытяжки соединяют и промывают серным эфиром для удаления остатков фенола и хлороформа, как указано выше.

Полученные тем или иным способом водные экстракты должны иметь характерную для витамина B_{12} розовую окраску. Количество витамина B_{12} определяют спектрофотометрически по измерению поглощения при 548 м μ , пользуясь толщиной в 1 см, и проводят расчет по формуле:

$$x = \frac{E \cdot V \cdot 10^4}{63},$$

где

x — содержание B_{12} в навеске в микрограммах;
 E — наблюдаемый коэффициент поглощения;

V — объем конечного раствора, в мл;

63 — коэффициент поглощения 1%-ного раствора витамина B_{12} , т. е. при содержании 10000 микрограммов витамина в 1 мл;

10^4 — коэффициент пересчета концентрации витамина B_{12} в процентного содержания на число микрограммов в 1 мл.

При отсутствии спектрофотометра можно пользоваться колориметром, откалиброванным по растворам кристаллического витамина B_{12} с известным его содержанием.

При измерении пользуются зеленым светофильтром.

В заключение следует отметить, что для уверенности в пригодности метода для исследуемого материала, следует рекомендовать его проверку путем определения количества витамина, добавленного к материалу. При работе с печеню, микселем и культуральными жидкостями нам удавалось определить не менее 90—95% добавленного витамина. Количество добавляемого витамина составляло 30—50% от его содержания в анализируемом материале.

ВЫВОДЫ

1. Разработан сравнительно простой химический метод определения витамина B_{12} , позволяющий вести пенитацию при наличии не менее 50—75 μg витамина во взятой навеске материала.

2. Метод основан на экстракции витамина водным раствором нитрита натрия, очистке водных экстрактов от мешающих примесей и спектрофотометрическом или колориметрическом определении витамина в очищенной вытяжке.

Литература

1. Boxer G. E., Rickards J. C. Chemical determination of vitamin B_{12} . I. Determination of 5,6-dimethylbenzimidazole by colorimetric and fluorometric methods. — Arch. of biochem., 29, (4), 75 (1950).
2. Fanthorpe K. H. a. Ireland D. M. A colorimetric assay method for vitamin B_{12} . — Biochem. J., 46, proc. XXXIV (1950).
3. Boxer G. E. a. Rickards J. C. Chemical determination of vitamin B_{12} . II. The quantitative isolation and colorimetric determination of millimicrogram quantities of cyanide. — Arch. biochem., 30, (2), 372 (1951).
4. Boxer G. E. a. Rickards J. C. Chemical determination of vitamin B_{12} . V. A modified procedure for the determination of cobalamins in liver concentrates. — Arch. biochem. a. biophys., 39(2), 281 (1952).
5. Ruckliff G. O. a. Taylor R. J. Chemical method for determining vitamin B_{12} . — Analyt. chem., 24, 1155 (1952).
6. Вукан В. Н., Арешкина Л. Я. и Кудева Л. С. Микро- и макрометоды определения витамина B_{12} . Биохимия, 49, вып. 6, 713, 1954.

ки до фотолитиза как избытка добавленного цианида, так и того цианида, который входит в состав других соединений, находящихся в вытяжке. Отгонка нередко затягивается на несколько суток. Единственным способом устранения этого затруднения явилась предварительная очистка вытяжек, которую, однако, необходимо довести до такой степени, при которой становится возможным определять витамин на основе его спектральных свойств, что значительно проще, чем определение по оптическому индексу.

Существенный интерес представляет работа по получению дицианидного комплекса витамина B_{12} [5]. Авторы ее показали возможность избирательного извлечения комплекса бензиловым спиртом и его определения спектрофотометрическим методом. Максимум поглощения дицианидного комплекса сдвигается в длинноволновую часть и расположен при 582 нм ($E_{1\%}^{1\text{см}} = 54$), в то время как для цианокобальмина он расположен при 548 нм ($E_{1\%}^{1\text{см}} = 63$).

Применяя ряд приемов очистки, мы разработали сравнительно простой метод количественного определения витамина B_{12} (6), которым и пользовались в течение некоторого времени. В дальнейшем оказалось, что этот метод может быть еще более упрощен и уточнен. Описание этого метода дается ниже.

Навеску испытуемого материала берут с таким расчетом, чтобы в ней содержалось не менее 50—75 мкг B_{12} , например, вымени рогатого скота—200 г, мицелия актиномицетов, выращенного с добавлением в среду солей кобальта—100—200 г рачиного с добавлением в среду солей кобальта—100—200 г при влажности мицелия около 80%, культуральной жидкости при влажности от условий выращивания микроорганизмов—0,5—1,0 литр и т. д.

Навеску печени измельчают, заливают 5-кратным количеством воды, туда же добавляют 0,25% (вес/объем) пикриновой кислоты и смесь кипятят при помешивании 20—30 мин. После этого к ней добавляют для осаждения белков 50%-ную уксусную кислоту из расчета 1 мл на 100 мл.

Жидкость фильтруют и остаток на фильтре промывают одним объемом подогретой воды, подкисленной, как указано выше. Промывные воды вместе с экстрактом поступают для адсорбции.

Мицелий актиномицетов заливают 3-кратным количеством воды, подкисляют до pH 5, добавляют 0,25% пикриновой кислоты и смесь выдерживают при помешивании при температуре 80—90° в течение 20—30 мин. Жидкость фильтруют

а мицелий промывают одним объемом подогретой и подкисленной воды.

Взятый объем культуральной жидкости подкисляют до pH 5, добавляют 0,25% пикриновой кислоты и жидкость выдерживают при 80—90° в течение 20—30 минут.

К подготовленным экстрактам добавляют порошкообразный активированный древесный уголь марки А в количестве, достаточном для полной адсорбции витамина. Например, для экстракта из печени—2%, экстракта из мицелия—1%, для культуральной жидкости—0,75%.

Количество угля можно варьировать в зависимости от содержания витамина B_{12} , состава экстрактов и адсорбционной активности самого угля. При работе с новыми образцами рекомендуется, поэтому, делать проверку максимального выхода витамина B_{12} при разных дозировках угля.

Адсорбцию на угле ведут при непрерывном помешивании в течение 15 мин. при комнатной температуре, затем уголь фильтруют и промывают холодной водой.

Для десорбции витамина B_{12} используют 10%-ный водный раствор н-бутилового спирта в сочетании со второй порцией обработкой: уголь заливают 20-кратным количеством по отношению к взятой навеске 10%-ного раствора бутилового спирта, в котором перед этим растворено 0,25% пикриновой кислоты (вес/объем), смесь кипятят при помешивании до 70°, выдерживают при этой температуре 20 мин. и водно-бутыловый экстракт фильтруют, не давая ему остыть. Уголь на фильтре промывают 4-кратным количеством подогретого водного бутилового спирта, который после промывания присоединяют к основному экстракту.

Водно-бутыловый экстракт насыщают сернистым аммонием (я. д. а.) и всплывший слой бутилового спирта, содержащий витамин B_{12} , отделяют. К водному остатку добавляют 2—3% чистого бутилового спирта, смесь хорошо перемешивают и дают отстояться. После отделения спиртового экстракта соединяют. Если в этих экстрактах обнаружены сульфиды и хлориды, то их удаляют центрифугированием и фильтрованием. Извлекают витамин B_{12} из экстракта малыми порциями подкисленной воды (0,01 н. НСН) до прекращения окрашивания добавляемой воды.

Водный экстракт подкисляют до pH 5, в нем растворяют 0,2% NaCN или KCN и выдерживают в течение 1 час. После этого добавляют для окисления KMnO_4 до розового

освобождения исследуемых вытяжек и гидролизатов от ингибирующих веществ, стимулирующих рост данного организма.

Более удобным индикаторным объектом явился *Lactobacillus arabinosus* [4], однако для его роста необходим ряд аминокислот.

Путем микробиологических методов определяется лишь свободная форма пантотеновой кислоты. Определение химически связанного витамина производят путем автолиза пенящегося образца или его ферментативного гидролиза.

Для количественного определения пантотеновой кислоты мы использовали очень чувствительную и специфическую реакцию на нее дрожжевого организма *Saccharomyces Ludwigii* KM. Эта культура нуждается в получении извне биотина, витаминов B₁ и B₆, никотиновой и пантотеновой кислот. β-Аланин, диоксидиметил-масляная кислота или смесь этих веществ не могут заменить для *S. Ludwigii* пантотеновую кислоту. Описываемый метод значительно проще и доступнее по сравнению с известными методами, в которых используются бактериальные индикаторные культуры — для этих методов требуются весьма сложные питательные среды.

Среды и растворы, необходимые для определения пантотеновой кислоты при помощи *Saccharomyces Ludwigii* KM.

1. Основная среда, на которой поддерживается культура *S. Ludwigii* — сусло-агар, приготовленный из сусла (7° Bal) с прибавлением 2% агара.

2. Сахаро-минеральная среда Ридер, в которую засевают индикаторную культуру.

Состав среды Ридер в %:

сахароза	— 2 (очищена от примесей активированным углем)
(NH ₄) ₂ SO ₄	— 0,3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	— 0,07
NaCl	— 0,05
Ca(NO ₃) ₂	— 0,04
KH ₂ PO ₄	— 0,1
K ₂ HPO ₄	— 0,01

Среду готовят на прокипяченной водопроводной воде и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм в течение 30 минут.

3. Растворы витаминов: B₁, B₆ и никотиновой кислоты (1000 мг/мл).

Раствор биотина (0,25 мг/мл).

4. Растворы пантотеновой кислоты (на мл — 1000 мг, 100, 10, 1, 0,01 мг).

Растворы всех витаминов стерилизуют прогреванием в кипящей водяной бане в течение 20 минут.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Составление стандартной кривой

1. Индикаторную культуру за двое суток до опыта пересевают на сусло-агар и выдерживают в термостате при 27°. Перед опытом из выросшей культуры готовят сильно разведенную суспензию на стерильной водопроводной воде (концентрация дрожжей — около 0,01%).

2. К сахаро-минеральной среде Ридер добавляют витамины B₁, B₆, никотиновую кислоту — по 1000 мг каждого витамина на 200 мл среды и биотин — 0,25 мг на 200 мл среды. Среду разливают стерильно по 10 мл в конические колбочки на 50 мл.

3. В колбочки прибавляют все возрастающие количества пантотеновой кислоты (на миллилитр среды — 0,001; 0,002; 0,004; 0,006; 0,008 мг).

4. Колбы засевают одной каплей приготовленной ранее суспензии и выдерживают в термостате при 27° в течение 40—48 часов.

5. Содержимое колб фильтруют через предварительно известненные мембранные фильтры № 3, смонтированные на приборе Зейтца. Фильтры с осадком сушат и взвешивают.

6. Вычерчивают стандартную кривую нарастания веса культуры (в мг сухого вещества в 10 мл среды за 40—48 час.) в зависимости от содержания пантотеновой кислоты в среде (в мг/мл)*.

Определение пантотеновой кислоты

1. Индикаторную культуру и среду готовят так же, как и при составлении стандартной кривой (п. 1 и 2).

2. Исследуемые на содержание пантотеновой кислоты растворы разводят и добавляют к среде с таким расчетом, чтобы концентрация определяемого витамина в конечном счете находилась между 0,002 и 0,006 мг/мл среды.

* Введение гидролизата казеина и дрожжевого гидролизата по фону максимальной дозы пантотеновой кислоты не дает дополнительного активирования роста культуры.

освобождения исследуемых вытяжек и гидролизатов от липидных веществ, стимулирующих рост данного организма. Более удобным индикаторным объектом явился *Lactobacillus arabinosus* [4], однако для его роста необходим ряд аминокислот.

Путем микробиологических методов определяется лишь свободная форма пантотеновой кислоты. Определение химически связанного витамина производят путем автолиза или тушения образца или его ферментативного гидролиза.

Для количественного определения пантотеновой кислоты мы использовали очень чувствительную и специфическую реакцию на все дрожжевого организма *Saccharomyces Ludwigii* КМ. Эта культура нуждается в получении извне биотина, витаминов В₁ и В₆, никотиновой и пантотеновой кислот. β -Аланин, диоксидиметил-масляная кислота или смесь этих веществ не могут замещать для *S. Ludwigii* пантотеновую кислоту. Описываемый метод значительно проще и доступнее по сравнению с известными методами, в которых используются бактериальные индикаторные культуры — для этих методов требуется весьма сложные питательные среды.

Среды и растворы, необходимые для определения пантотеновой кислоты при помощи *Saccharomyces Ludwigii* КМ.

1. Основная среда, на которой поддерживается культура *S. Ludwigii* — сусло-агар, приготовленный из сусла (7° Bal) с прибавлением 2% агара.

2. Сахаро-минеральная среда Ридер, в которую засевают индикаторную культуру.

Состав среды Ридер в %:

сахароза	— 2 (очищена от примесей активированным углем)
(NH ₄) ₂ SO ₄	— 0,3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	— 0,07
NaCl	— 0,05
Ca(NO ₃) ₂	— 0,04
KH ₂ PO ₄	— 0,1
K ₂ HPO ₄	— 0,01

Среду готовят на прокипяченной водопроводной воде и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм в течение 30 минут.

3. Растворы витаминов: В₁, В₆ и никотиновой кислоты (1000 мкг/мл).

Раствор биотина (0,25 мкг/мл).

4. Растворы пантотеновой кислоты (на мл — 1000 мкг, 100, 10, 10,1, 0,01 мкг).

Растворы всех витаминов стерилизуют прогреванием в кипящей водяной бане в течение 20 минут.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Составление стандартной кривой

1. Индикаторную культуру за двое суток до опыта пересевают на сусло-агар и выдерживают в термостате при 27°.

Перед опытом из выросшей культуры готовят сильно разведенную суспензию на стерильной водопроводной воде (концентрация дрожжей — около 0,01%).

2. К сахаро-минеральной среде Ридер добавляют витамины В₁, В₆, никотиновую кислоту — по 1000 мкг каждого витамина на 200 мл среды и биотин — 0,25 мкг на 200 мл среды. Среду разливают стерильно по 10 мл в конические колбочки на 50 мл.

3. В колбочки прибавляют все возрастающие количества пантотеновой кислоты (на миллилитр среды — 0,001; 0,002; 0,004; 0,006; 0,008 мкг).

4. Колбы засевают одной каплей приготовленной ранее суспензии и выдерживают в термостате при 27° в течение 40—48 часов.

5. Содержимое колб фильтруют через предварительно взвешенные мембранные фильтры № 3, смонтированные на приборе Зейтца. Фильтры с осадком сушат и взвешивают.

6. Вычерчивают стандартную кривую нарастания веса культуры (в мг сухого вещества в 10 мл среды за 40—48 час.) в зависимости от содержания пантотеновой кислоты в среде (в мкг/мл)*.

Определение пантотеновой кислоты

1. Индикаторную культуру и среду готовят так же, как и при составлении стандартной кривой (п. 1 и 2).

2. Исследуемые на содержание пантотеновой кислоты растворы разводят и добавляют в среду с таким расчетом, чтобы концентрация определяемого витамина в конечном счете находилась между 0,002 и 0,006 мкг/мл среды.

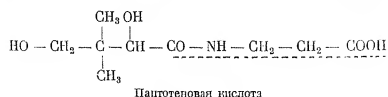
* Введение гидролизата казеина и дрожжевого автолизата по фону максимальной дозы пантотеновой кислоты не дает дополнительного активирования роста культуры.

Н. А. ПОМОЩНИКОВА

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

Пантотеновая кислота встречается во всех животных и растительных тканях, преимущественно в связанной форме. В большом количестве она содержится в печени, почках, в зернах хлебных злаков и в дрожжах.

По своей химической природе пантотеновая кислота представляет собой соединение, построенное из остатков β-аланина и α-γ-диоксип-β-β-диметилмасляной кислоты. При получении пантотеновой кислоты путем химического синтеза завершающий этап состоит в конденсации β-аланина с диоксидометилмасляной кислотой. Имеющиеся данные указывают на то, что и биологический синтез заканчивается аналогичным образом.



Как видно из приведенной формулы, в состав пантотеновой кислоты входит остаток β-аланина (отмечен пунктиром).

Пантотеновая кислота наиболее устойчива в виде солей натрия и кальция. 1,087 Са-пантотената эквивалентны 1 части пантотеновой кислоты.

В таблице приведены физические и химические свойства пантотеновой кислоты и пантотената кальция.

Оба соединения разрушаются под действием кислоты, щелочи и при сильном нагревании.

Ацетат, бензоат и дифосфорный эфир пантотеновой кислоты активны в отношении животных, но не используются микробными бактериями и дрожжами.

Таблица

Физические и химические свойства пантотеновой кислоты и пантотената кальция

Свойства	Пантотеновая кислота	Пантотенат кальция
Физические признаки	Бесцветная, масляобразная жидкость	Белая микрокристаллическая соль
Эмпирическая формула	$\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{N}$	$(\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{N})_2\text{Ca}$
Молекулярный вес	219,2	476,5
Растворимость:		
» в воде	Легко растворяется	Легко растворяется
» этилацетате	То же	—
» нейтральной уксусной кислоте	»	—
» эфире	Слабо растворяется	—
» этиловом спирте	То же	—
» бензоле	Не растворяется	—
» хлороформе	То же	—

Пантотенол (или пантотениловый спирт) обладает активностью, почти равной активности пантотеновой кислоты. Большинство животных организмов требует для своего роста полной молекулы пантотеновой кислоты. Дрожжи, за некоторыми исключениями, и некоторые штаммы дифтерийных бактерий удовлетворяются молекулой β-аланина. Гемолитические бактерии нуждаются в обязательном присутствии в среде диоксидометилмасляной кислоты.

Пантотеновая кислота входит в состав кофермента А (кофермент ацетилирования), который участвует в углеводном, белковом и жировом обмене, а также в обмене уксусной кислоты. Роль кофермента А, а следовательно, и пантотеновой кислоты в обмене веществ связана с активацией карбоксильных групп, необходимой для осуществления различных биохимических процессов.

Большая часть пантотеновой кислоты в тканях присутствует в форме кофермента А.

Существует несколько методов определения пантотеновой кислоты. В 1937—1939 гг. был предложен метод учета этого витамина по ростовой реакции дрожжей [1]. Позднее были разработаны более быстрые и точные методы определения пантотеновой кислоты при помощи бактерий и дрожжевых организмов. Использование в качестве индикаторной культуры *Lactobacillus casei* [2, 3] требует предварительного

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

1. Составление стандартной кривой

1. Индикаторную культуру *Saccharomyces Ludwigii* KM пересевают за двое суток до опыта на сусло-агар и выдерживают в термостате при 27°. Перед постановкой опыта готовят сильно разведенную суспензию дрожжей с концентрацией около 0,01% на стерильной водопроводной воде.

2. К среде Ридер добавляют 2% облученного автолизата или необходимые для индикаторной культуры витамины (кроме пиридоксина) в количестве 1 мл исходного раствора на 200 мл среды. Среду разливают стерильно в конические колбочки (на 50 мл) по 10 мл в каждую.

3. В колбочки добавляют все возрастающие количества пиридоксина: 0,0001; 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 и 1 мг/мл среды.

4. Колбы засевают каплей разведенной ранее суспензии дрожжей и выдерживают в термостате при 27° в течение 40–48 часов.

5. Содержимое колб фильтруют через предварительно нагретые мембранные фильтры № 3, смонтированные на приборе Зейтца. Фильтры сушат и взвешивают.

6. Вычерчивают стандартную кривую нарастания веса культуры (в мг сухого вещества) в 10 мл среды за 40–48 час. в зависимости от содержания пиридоксина в среде (и мг/мл).

II. Определение витамина B₆

1. Готовят индикаторную культуру и среду так же, как указано в разделе I (п. 1 и 2).

2. Исследуемые на содержание пиридоксина растворы (биологические жидкости, автолизаты, гидролизаты и вытяжки) разводят и добавляют в среду с таким расчетом, чтобы концентрации определяемого витамина в конечном счете находились между концентрациями, соответствующими 0,0001 и 0,01 мг/мл среды.

3. Колбочки засевают таким же количеством индикаторной культуры, как и при установлении стандартной кривой, и ставят на 40–48 час. в термостат при 27°.

4. По сухому весу культуры, собранной так же, как указано в разделе I, устанавливают, пользуясь стандартной кривой, содержание пиридоксина в миллилитре индикаторной

среды. Зная степень разведения, вычисляют содержание пиридоксина в образце.

5. При определении пиридоксина в новом неисследованном еще субстрате целесообразно подвергнуть часть пробы облучению ртутно-кварцевой лампой и установить, не содержит ли этот субстрат после разрушения пиридоксина каких-либо активирующих или угнетающих развитие индикаторной культуры веществ. В случае обнаружения таковых это должно быть принято во внимание при окончательных расчетах.

ВЫВОДЫ

1. Разработан простой микробиологический метод определения витамина B₆ (пиридоксина) при помощи дрожжевой культуры *Saccharomyces Ludwigii* KM.

2. Индикаторный дрожжевой организм требует обязательного присутствия в питательной среде пяти витаминов: тиамина (B₁), биотина, пантотеновой кислоты, никотиновой кислоты и пиридоксина (B₆). Все витамины, за исключением определяемого пиридоксина, могут быть заменены дрожжевым автолизатом, предварительно облученным кварцевой ультрафиолетовой лампой.

3. Предложенный метод дает возможность определять от 0,001 до 0,03 мг витамина B₆ в миллилитре испытуемого раствора.

Литература

1. Sneli E. Vitamin methods. Edit. by P. György, I, 327, 1950.
2. Труфанов А. В. Витамины группы B₆ (пиридоксин и его производные) и участие их в энзиматических реакциях. Успехи современной биологии, 25, 19, 1948.
3. Нерусалинский Н. А. Азотное и витаминное питание микробов. — Изд. АН СССР, Москва, 1959.
4. Марадзинев С. Р. Микробиологические и энзиматические методы количественного определения аминокислот. — Успехи биологической химии (Ежегодник), I, 281, 1950.
5. Tatum E., Ritchey M., Cowdry E. a. Wicks R. Vitamin content of mouse epidermis during methylcholanthrene carcinogenesis. — J. biol. chem., 163, 675, 1946.
6. Williams R., Eakin R. a. McMahon J. Assay method for pyridoxin. Studies on the vitamin content of tissues I. University Texas publications, № 4137, 24, 1941.
7. Atkin L., Schuller A., Williams W. a. Frey C. Yeast microbiological methods for determination of vitamin pyridoxine. — Ind. eng. chem., Anal. ed., 15, 141, 1943.
8. Burkholder P. Vitamin deficiencies in yeasts. — Am. j. botany, 30, 206, 1943.

В случае отсутствия метафосфорной кислоты можно всю работу проводить с одной соляной кислотой. После 10—15-минутного стояния содержимое колбы тщательно перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр.

Из фильтрата берут по 2—5 мл в два стаканчика по 50 мл и титруют из микробюретки (лучше на 5 мл) 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолидофенола. Для расчета берут среднее из 2 титрований.

Расчет производят по формуле

$$\frac{a \cdot n \cdot v}{p \cdot v_1} 100 = \text{мг \% аскорбиновой кислоты,}$$

где:

a — мл 2,6-дихлорфенолидофенола, использованного для титрования;
 n — поправка для перевода мл 2,6-дихлорфенолидофенола в мг аскорбиновой кислоты;

p — навеска материала в г;

v — объем жидкости, в которой растворена навеска, в мл;

v_1 — объем, взятый на титрование, в мл;

100 — пересчет на 100 г вещества для получения результатов в мг %.

Титр краски (2,6-дихлорфенолидофенола) устанавливают по аскорбиновой кислоте по методу С. М. Прокошева [3]. Для этой цели растворяют несколько мг аскорбиновой кислоты, взятых на глаз в 50 мл 2%-ной H_2SO_4 . Берут 5 мл этого раствора и титруют раствором краски до появления слабо розового, не исчезающего в течение 5 мин. цвета. Параллельно титруют 5 мл (взятой той же пипеткой) 0,001 н. раствором KIO_3 до слабо голубого цвета. Перед титрованием иодатом калия в стаканчик добавляют несколько кристалликов (2—3 мг) KI и 2—3 капли раствора крахмала. Титрование в обоих случаях ведут из микробюреток.

Титр краски рассчитывают на основании того, что 0,088 мг аскорбиновой кислоты эквивалентны как 0,001 н. раствору иодата калия, так и 0,001 н. раствору краски. Имея точно 0,001 н. раствор иодата калия и проведя вышеописанное титрование, производят расчет титра.

$$\text{Титр краски} = \frac{0,088 \cdot a}{b} \text{ мг аскорбиновой кислоты,}$$

где a — мл KIO_3 , пошедшего на титрование 5 мл раствора аскорбиновой кислоты;

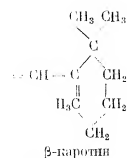
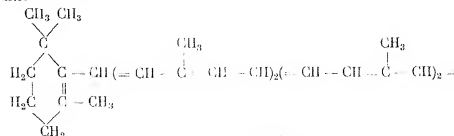
b — число мл краски, пошедшей на титрование 5 мл того же раствора.

Л и т е р а т у р а

1. Букян В. П. Химический метод определения витамина С. Изд. ВАСХНИЛ, 1935.
2. Деятин В. А. и Иосикова В. М. Свицово-сероводородный метод. Методы определения витаминов, стр. 41. Пищепромиздат, 1951.
3. Прокошев С. М. К определению аскорбиновой кислоты. — Лабораторная практика, 3, 15, 1941.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРОТИНА (ПРОВИТАМИНА А) ПО МУРРИ [1]

Ниже приводится методика суммарного определения изомеров α -, β - и γ -каротина, строение одного из которых (β -каротина) представлено ниже.



В основе метода лежит хроматографическое отделение каротина от сопутствующих пигментов (хлорофилла, ксантофилла, ликопина и др.), предложенное М. С. Цветом. В случае необходимости определения изомеров каротина в отдельности следует проводить его дальнейшее разделение на адсорбционной колонке, на чем мы останавливаться не будем.

Необходимые реактивы и приборы:

1. Петролейный эфир или легкие фракции бензина.
2. Сернистый натрий безводный.
3. Окись магния (MgO) или окись алюминия (Al_2O_3).
4. 0,036%-ный раствор двуххромовокислого калия ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$); 1 мл такого раствора соответствует 2,08 мг каротина.
5. Колориметр, лучше фотоэлектронколориметр.

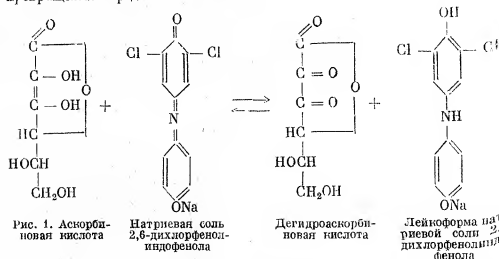
При определении содержания каротина в свежих материалах их предварительная сушка не допускается, так как каротин при этом разрушается.

Иследуемый материал измельчают на мясорубке или терке и тщательно перемешивают, из полученной массы берут 2 навески (для двух параллельных определений), переносят в фарфоровые ступки и растирают с 4—5-кратным количеством безводного сернистого натрия для обезвоживания материала. Ввиду того что каротин легко разрушается на воздухе, следует все манипуляции проводить очень быстро. При особо

ПРИЛОЖЕНИЕ

ХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ВИТАМИНА С)

Метод определения аскорбиновой кислоты основан на ее способности обратимо окисляться и восстанавливаться, благодаря наличию в ее молекуле эндольной группировки. Специфичным индикатором для определения аскорбиновой кислоты является 2,6-дихлорфенолиндифенол, соединение, обладающее двойным изменением окраски, с одной стороны, при изменении pH среды от щелочной к кислой цвет раствора индикатора меняется от интенсивно синего до яркорозового, с другой, окисленное соединение имеет окраску, а восстановленное — бесцветно. Строение аскорбиновой кислоты, 2,6-дихлорфенолиндифенола и их взаимные превращения представлены ниже.



Ниже приводится подробное описание методики определения аскорбиновой кислоты, которая может быть применена к большинству растительных и животных тканей. При анализировании окрашенных объектов или объектов, содержащих заметные количества обратимо-окисленной формы аскорбиновой кислоты (обычно объекты, подвергавшиеся той или иной переработке), следует применять ртутно-сероводородный метод В. Н. Букина [1] или свинцово-сероводородный метод В. А. Девяткина и В. М. Иосифовой [2].

Химический метод определения аскорбиновой кислоты 189

Первый метод является более точным по сравнению с методом Девяткина, и вытяжки, поступающие на титрование, всегда совершенно бесцветны и прозрачны. Метод Девяткина имеет преимущество перед ртутно-сероводородным в том, что не применяются ядовитые вещества (судан и уксуснокислая ртуть), но вытяжки бывают иногда не полностью обезврежены и всегда небезопасны для употребления.

Необходимые реактивы

- 1) 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндифенола. Навеску 0,3 г 2,6-дихлорфенолиндифенола растворяют в 700 мл дистиллированной воды с добавлением 1—2 капель 0,1 н. NaOH, сильно взбалтывают и оставляют на 1—2 часа (лучше на ночь), встряхивая время от времени. Затем фильтруют и доводят объем до 1 литра. Раствор может быть использован в течение периода до 7—14 дней при хранении в темноте и на холоду.
 - 2) 1%-ная соляная кислота (23 мл концентрированной HCl с удельным весом 1,19 доводит дистиллированной водой до 1 л).
 - 3) 2%-ная метафосфорная кислота (20 г кристаллической H_3PO_3 растворяют и доводят водой до 1 л).
 - 4) 2%-ная серная кислота (11,4 мл концентрированной H_2SO_4 с удельным весом 1,84 доводит до 1 л).
 - 5) Аскорбиновая кислота — кристаллическая.
 - 6) 0,001 н. раствор подата калия (KIO_3). Отвешивают на аналитических весах 0,3568 г подата, предварительно высушенного в течение 2 часов при 104° , растворяют в воде и доводят объем до 1 л. Такой раствор является 0,01 н. В день определения титра его разбавляют в 10 раз, для чего берут 10 мл исходного раствора и доводят в мерной колбе до 100 мл дистиллированной водой. Исходный раствор устойчив в течение нескольких месяцев при хранении в темноте.
 - 7) Иодистый калий кристаллический (KI).
 - 8) 1%-ный раствор растворимого крахмала.
- Навеску материала, величина которой обуславливается содержанием аскорбиновой кислоты в исследуемом объекте, заливают небольшим количеством 1%-ной HCl так, чтобы вся навеска была покрыта кислотой. Навеску берут из расчета, чтобы в 5 мл предназначенной для титрования вытяжки содержалось 0,15—0,20 мг аскорбиновой кислоты. При взятии навески следует избегать измеляющих приспособлений из железа и меди. Навеску тщательно растирают с кварцевым песком в фарфоровой ступке. Добавляют соляную кислоту и навеску переносят в мерную колбу на 100 мл. Затем в колбу добавляют 2%-ную метафосфорную кислоту из расчета 1/3 от общего объема и доводят до метки 1%-ной HCl. Метафосфорную кислоту добавляют для удаления белков и облегчения фильтрования (для животных тканей следует применять 20%-ную трихлоруксусную кислоту в тех же соотношениях).

2. Разделение эргостерина и холестерина. Эргостерин отделяется от других стеридов при восходящем способе хроматографирования с 72%- или 78%-ным этиловым спиртом или 90%-ным метиловым спиртом. Бумагу пропитывают

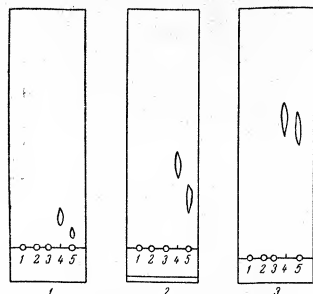


Рис. 3. Хроматограммы отделения витамина D от других стеридов.

(Уменьшено в 5 раз)
1—восходящая; подвижная фаза — 72%-ный метиловый спирт. Бумага пропитана 1%-ным раствором парафина в хлороформе. Продолжительность хроматографирования — 15 час. при t 22°;
2—нисходящая; подвижная фаза — 80%-ный метиловый спирт. Бумага пропитана 2М раствором KH_2PO_4 . Продолжительность хроматографирования — 15 час. при t 20°;
3—восходящая; подвижная фаза — 80%-ный метиловый спирт. Бумага ацетилюрована. Продолжительность хроматографирования — 15 час. при t 20°.

1%-ным раствором парафина без предварительной ее обработки соляной кислотой (рис. 2, 1, 2, 3). Полного отделения эргостерина достигают при употреблении 78%-ного этилового спирта на бумаге, пропитанной водным 2М раствором KH_2PO_4 (рис. 2, 4).

Хроматограммы на рис. 2, 1, 2, 3, 4 показывают, что эргостерин не продвигается по бумаге, остается в точке нанесения, а все остальные стериды продвигаются по ней далеко по фронту с R_f , близким к единице.

3. Отделение витамина D от других стеридов. Для отделения витамина D подобраны условия, при которых по бумаге продвигается только витамин D, а остальные стериды остаются в точке их нанесения (хроматограммы на рис. 3, 1, 2, 3).

Хроматограмма на рис. 3, 1 получена при употреблении 72%-ного метилового спирта на бумаге, пропитанной 1%-ным парафином, без предварительного отмывания ее водой. Для витамина D за 15 час. при восходящем способе при 22° $R_f = 0,3$, остальные стериды совсем не продвигаются.

Хроматограмма на рис. 3, 2 получена при использовании бумаги, пропитанной 2М KH_2PO_4 с 85%-ным метиловым спиртом. При нисходящем способе за 15 час. при 20° витамин D продвигается с $R_f = 0,68$, в то время как остальные стериды остаются на месте.

Хроматограмма на рис. 3, 3 получена с 80%-ным метиловым спиртом при восходящем методе на ацетилюрованной бумаге. Для витамина D за 15 час. при 20° $R_f = 0,63$. Остальные стериды остаются в точке нанесения.

Примечание. Хроматограмму после подвижной фазы, состоящей из водного спирта, особенно 72%-ного метилового или этилового спирта, следует тщательно просушивать при комнатной температуре. При проявлении недосушенной хроматограммы следы влаги гидратируют треххлористую сурьму, отчетливо витамин D может проявиться слабо или не проявиться совсем, если в исследуемом материале он присутствует в количестве, не превышающем 5 мкг.

II. Разделение стеридов в экстрактах из различных продуктов

Применение вышеописанных условий хроматографирования для определения витамина D и стеридов показало, что определение витамина D в образцах, содержащих мало витамина (100—300 инт. ед. в 1 г) и много стеридов (больше 2 мг на 1 г), невозможно. В этих условиях в пробе, применяемой для нанесения обычного пятна, присутствует такое незначительное количество витамина D, которое не проявляется. Нанесение большего количества раствора (0,1 мл вместо 0,005 мл) с целью надежного обнаружения витамина D (не менее 300—400 инт. ед.) ведет к тому, что стериды ввиду больших концентраций в этом случае не разделяются и идут сплошной полосой.

Отделение стеридов от витамина D хорошо достигается вымораживанием в метиловом спирте. Если требуется определить только витамин D, можно не отфильтровывать выпавшие стериды и отбирать пробу микропипеткой, у которой нижний конец обернут маленьким кусочком ваты. Для разделения стеридов их осадок в метиловом спирте отфильтровывают на микроворонке, вымораживание повторяют из меньшего

4 — витамин D₂ и в точке 5 — смесь указанных веществ. Хроматограммы получены за 17–22 часа при температуре 20–22° (табл. 2).

Проявленная хроматограмма быстро подсыхала, пятна стерина становились грязно-синими, а бумага, разведенная соляной кислотой, образовавшейся в процессе гидролиза треххлористой сурьмы, рассыпалась при первом прикосновении. Поэтому для каждой хроматограммы вели запись условий и результатов разделения стерина с тем, чтобы по записи можно было изобразить хроматограмму. В табл. 2 приведен пример такой записи. По этой записи составлена хроматограмма, приведенная на рис. 1, 1.

Таблица 2

Разделение некоторых стерина на бумаге, пропитанной 1%-ным раствором парафина в хлороформе, при нисходящем способе

Наименование веществ, нанесенных на бумагу	Нанесено вещества			Условия хроматографирования		Продвижение по фронту в см		R _f	Длина пятна в см
	в мл	в рг	Т	продолжительность в часах	подвижная фаза	фазы	пигмента		
Смесь:	0,025	100	20	22	87%-ный метиловый спирт	При стекании раствора на линии фронта			
эргостерин . . .	0,005	20					0	0	0,5
холестерин . . .	0,01	40					0	0	0,5
7-дегидрохолестерин . . .	0,005	20					21,5	0,43	4
витамины D ₂ . . .	0,005	20					40,5	0,81	7
Свидетели, нанесенные отдельно:						50			
эргостерин . . .	0,005	20	20	22			0	0	0,5
холестерин . . .	0,01	40	20	22			0	0	0,5
7-дегидрохолестерин . . .	0,005	20	20	22			22	0,44	3
витамины D ₂ . . .	0,005	20	20	22			40,5	0,81	3

Как видно из табл. 2 и хроматограмм, приведенных на рис. 1 (рис. 1, 1–5), эргостерин и холестерин остаются в точке нанесения, 7-дегидрохолестерин и витамин D₂ продвигаются по фронту с разницей в R, позволяющей осуществить их разделение.

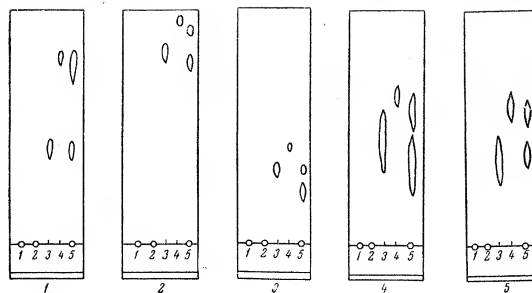


Рис. 1. Хроматограммы разделения некоторых стерина на бумаге, пропитанной раствором парафина в хлороформе.

(Уменьшено в 5 раз)
1 — 1%-ным; 2 — 2%-ным; 3 — 3%-ным; 4 — 4%-ным раствором вазелина в хлороформе; 5 — 2%-ным раствором растительного масла в хлороформе.

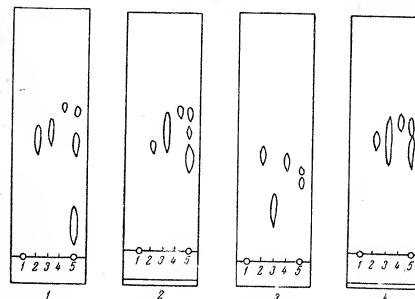


Рис. 2. Хроматограммы отделения эргостерина от других стерина на бумаге, пропитанной 1%-ным раствором парафина в хлороформе (1, 2, 3) и 2М KClO₄ (4)

(Уменьшено в 5 раз)
1 — восходящая хроматограмма; подвижная фаза — 72%-ный этиловый спирт. Продолжительность хроматографирования — 21 час при t 22°. 2 — нисходящая; подвижная фаза — 78%-ный этиловый спирт. Продолжительность хроматографирования — 20 час. при t 24°. 3 — восходящая; подвижная фаза — 30%-ный метиловый спирт. Продолжительность хроматографирования — 20 час. при t 19°. 4 — нисходящая; подвижная фаза — 78%-ный этиловый спирт. Продолжительность хроматографирования — 7 час. при t 26°.

качества хроматографической бумаги, так и при изучении подвижной фазы по ширине полоски бумаги в 14 см наносят капли в четырех-пяти точках; в трех-четыре точки наносят растворы чистых стерина и витаминов, и в одной точке — смесь тех же веществ. Капли наносят микропипеткой (по 0,005 мл в каждую точку с содержанием в этом объеме 20 мкг растворенного вещества), а для точки со смесью — по 0,005 мл тех же растворов с общим содержанием растворенных веществ 80—100 мкг. После высушивания нанесенных растворов при комнатной температуре в фен или настольным вентилятором бумагу помещают в хроматографическую камеру, насыщенную парами растворителя, налитого в небольшом количестве на дно камеры. Через 30—40 мин. лист бумаги при восходящей хроматограмме опускают в растворитель на глубину 1—1,5 см тем концом, на который нанесены исследуемые растворы. При нисходящей хроматограмме лодочку, в которую помещен конец бумаги с нанесенными исследуемыми растворами, заливают растворителем. Камеру плотно закрывают крышкой с притертыми краями, смазанными вазелином, и отмечают время начала хроматографирования. После того как растворитель прошел больше половины длины листа бумаги или хроматограмма выдерживалась определенное число часов и растворитель достиг конца листа, бумагу вынимают, отмечают время конца хроматографирования и высушивают ее при комнатной температуре.

Примечание. Удобно пользоваться как при сушке хроматограмм, так и при нанесении пятен настольным вентилятором.

Проявление хроматограммы. Растворяют 50 г треххлористой сурьмы в 50 мл отмытого сухого хлороформа при слабом нагревании на песчаной бане и тут же 30—40 мл горячего, доведенного почти до кипения, раствора наливают в эмалированную или керамическую кювету. Для проявления полоску бумаги опускают в слой раствора треххлористой сурьмы концом, где нанесены пятна стерина, и, не выпуская из рук конец, бумагу проводят ею в растворе реактива всей длиной листа, где прошла подвижная фаза. Проявленные пятна тут же обводят простым мягким карандашом, так как окрашенные пятна в течение 1—2 час. сначала приобретают фиолетовую окраску, а затем выцветают.

Только что проявленные пятна стерина сильно различаются по окраске. Пятна эргостерина окрашиваются в розово-фиолетовый цвет, холестерина и 7-дегидрохолестерина — в розовый, витамина D₂ — в ярко лимонный и витамина D₃ — в розово-фиолетовый цвет.

После добавления хлористого ацетила к хлороформенному раствору треххлористой сурьмы окраска пятен стерина изменяется. Пятна эргостерина и холестерина окрашиваются в розовый цвет, 7-дегидрохолестерина — в розово-фиолетовый и витаминов D₂ и D₃ — в яркооранжевый. Это различие в окраске пятен дает возможность определить 7-дегидрохолестерин и витамины D₂ и D₃ в подвижных фазах несмотря на то, что разница в величинах их R_f не превышает 10%. Минимальные количества, которые могут быть обнаружены с данным проявителем (50%-ный раствор треххлористой сурьмы в хлороформе), равны 5—10 мкг для эргостерина и 7-дегидрохолестерина, 5 мкг — для витаминов D₂ и D₃ и 20 мкг — для холестерина.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ РАЗДЕЛЕНИЯ ПРОВИТАМИНОВ И ВИТАМИНОВ D ПУТЕМ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ НА БУМАГЕ

Все полученные нами данные изложены ниже в следующем порядке.

- I. Разделение смеси, составленной из чистых стерина.
- II. Разделение стерина в экстрактах из различных продуктов (жиры, сыворотка крови и др.).
- III. Количественное определение витаминов группы D в экстрактах омыленных жиров и других объектах.
- IV. Разделение витаминов D₂ и D₃ при их совместном присутствии в экстрактах.

I. Разделение смеси, составленной из чистых стерина

1. Разделение эргостерина и 7-дегидрохолестерина. Близкое сходство в строении стерина, как указывалось выше, затрудняет разделение их смесей на хроматографической бумаге. Смесь, состоящую из нескольких стерина, можно разделить только при условии применения нескольких хроматограмм. Полное разделение провитаминов достигается на нисходящей хроматограмме с применением в качестве подвижной фазы 87%-ного метилового спирта. Бумага должна быть отмыта 10%-ным раствором HCl и пропитана 1—3%-ным раствором парафина в хлороформе или 2%-ным касторовым маслом. Более четкие и небольшие пятна стерина получают на бумаге, пропитанной 3%-ным раствором парафина (рис. 1, 2, 3, 4 и 5). На всех хроматограммах в точке 1 наносили эргостерин, в точке 2 — холестерин, в точке 3 — 7-дегидрохолестерин, в точке

отфильтровывают, фильтрат проверяют на отсутствие следов PbS и его объем доводят до 1 л.

Раствор цистина. 4 г л-цистина суспендируют в 50 мл горячей воды, прибавляют по каплям концентрированную соляную кислоту до полного растворения цистина, доводят объем до 1 л водой.

Раствор неорганических солей готовят в двух отдельных колбах. Раствор А содержит в 250 мл 25 г K_2HPO_4 и 25 г KH_2PO_4 ; раствор Б содержит в 250 мл 0,5 г $MgSO_4$, 0,5 г $NaCl$, 0,5 г $FeSO_4$ и 0,5 г $MnSO_4$.

Для приготовления основной среды на 50 пробирок ингредиенты берутся в следующих соотношениях: глюкозы — 5 г; раствора пептона — 50 мл; раствора цистина — 12,5 мл; дрожжевого экстракта — 10 мл; раствора солей А — 2,5 мл; раствора солей Б — 2,5 мл; pH среды доводят 1 н. NaOH до 6,6—6,8 и объем смеси доводят до 250 мл. Концентрация полученной среды в 2 раза выше концентрации среды, на которую производят посев. Нужную концентрацию среды получают добавлением испытуемых вытяжек или воды.

Стандартный раствор рибофлавина (40 μ г в 1 мл) — тот же, что и при химических определениях; его разводят водой так, чтобы конечная концентрация раствора была равна 0,1 μ г в 1 мл.

Рабочий раствор готовят каждый раз перед постановкой опыта.

Подготовка образцов

Для определения рибофлавина в трех образцах необходимо иметь 45 обычных химических пробирок. Во все пробирки вносят по 5 мл основной среды. 16 пробирок служат для получения стандартной кривой; для этого в две пробирки добавляют по 5 мл воды (нулевая проба); в следующие пробирки вносят возрастающие количества рабочего раствора рибофлавина: 0,5; 1,0; 1,5; 2; 2,5; 3 и 5 мл. Во всех пробирках объем жидкости доводят водой до 10 мл. Для каждой концентрации рибофлавина берут две пробирки. Таким образом получают стандартный ряд пробирок с концентрацией рибофлавина в 0,0; 0,005; 0,01; 0,015; 0,02; 0,025; 0,03 и 0,05 μ г в 1 мл.

Для опытного образца берут 10 пробирок и также вносят все возрастающие количества растительной вытяжки: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 и 5,0 мл. Объем жидкости доводят водой до 10 мл. Для каждой концентрации берут по две пробирки.

Все пробирки стерилизуют в автоклаве в течение 15—20 мин. при 1 атм и охлаждают до комнатной температуры. Затем в каждую пробирку вносят по 2 капли посевного материала, приготовленного, как указывалось выше, и помещают пробирки в термостат при 37° на 48 часов. После этого содержимое каждой пробирки выливают в колбочку, пробирку несколько раз

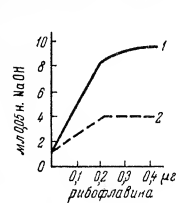


Рис. 1. Образование молочной кислоты при различных сроках выращивания культуры *Lactobacillus casei* — 48 часов (1) и 24 часа (2)

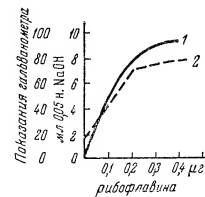


Рис. 2. Стандартные кривые для рибофлавина, полученные титрованием молочной кислоты (1) и определением мутности среды (2)

промывают водой, которую сливают в ту же колбочку, и образующуюся молочную кислоту титруют 0,1 н. NaOH с бромтимолом в качестве индикатора.

Очень важно до начала опыта тщательно установить необходимую величину pH основной среды и испытуемых вытяжек, иначе могут быть получены неправильные результаты. Обычно на титрование нулевой пробы должно пойти не более 1,0—1,5 мл 0,1 н. NaOH. На титрование пробирок с высшими концентрациями рибофлавина (0,025—0,03 μ г) должно быть использовано около 10—12 мл NaOH (рис. 1). Результаты титрования параллельных проб не должны расходиться больше чем на 0,2 мл. По данным титрования опытных пробирок находят содержание в них рибофлавина путем простой интерполяции стандартной кривой. Результаты, выходящие за пределы стандартной кривой (0,005 и 0,025 μ г на 1 мл), отбрасывают; полученные величины сравнивают для того, чтобы убедиться, сходятся ли они при различных разбавлениях испытуемого образца. Если максимум отклонений не превосходит 20%, из всех величин выводят среднее. Для получения

Как видно, начальные стадии приготовления вытяжек совпадают со способом приготовления вытяжек для флуорометрического метода определения рибофлавина. Но при микробиологическом способе определения нет необходимости подвергать материал фосфатазному гидролизу, так как микроорганизмы способны усваивать как свободный рибофлавин, так и моно- и динуклеотидные его формы.

В табл. 1 приведено сопоставление данных микробиологических и флуорометрических определений.

Таблица 1

Сопоставление микробиологических и флуорометрических определений рибофлавина (в $\mu\text{г}$ на 1 г естественно влажного материала)

Объект исследования	Содержание непрочного связанного с белком рибофлавина при определении			Содержание общего рибофлавина при определении		
	химическим методом (I)	микробиологическим методом (II)	II в % от I	химическим методом (I)	микробиологическим методом (II)	II в % от I
Мясо	1,5	1,7	113	2,94	3,10	105
Печень	37,0	40,0	108	39,0	42,0	108
Горох } семена	2,35	2,5	106	4,53	4,69	103
Фасоль }	0,56	0,61	109	1,35	1,59	117
Пшеница (зерно)	1,85	2,10	113	3,55	4,00	113
Нагустя цветная	0,84	0,87	103	1,46	1,63	111
Картофель (клубни)	0,4	0,4	100	0,82	0,82	100
Дрожжи	31,0	31,0	100	33,0	35,0	106

Как видно из приведенных в таблице данных, результаты определения рибофлавина обоими методами хорошо совпадают.

Ниже мы приводим описание микробиологического метода, уже не останавливаясь на вопросах приготовления образцов, укажем лишь необходимые для этого реактивы:

1) Фосфатный буфер (рН 7,8—8,0); готовят 1/15 М раствор $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, т. е. 11,876 г в 1 л, и 1/15 М раствор KH_2PO_4 , т. е. 9,078 г в 1 л; на 95 частей первого раствора берут 5 частей второго и рН буферной смеси проверяют по универсальному индикатору.

2) 0,1 н. раствор серной кислоты.

3) Препараты протеолитических ферментов: трипсин, панкреатин или клараза.

Основную культуру *L. casei* выращивают на агаровой среде, которую готовят следующим образом: 3 г агар-агара растворяют в 100 мл горячей воды, добавляют 1 г глюкозы и 4 мл дрожжевого экстракта (приготовление дрожжевого экстракта см. ниже). Смесь доводят до 200 мл и разливают в пробирки по 10 мл в горячем виде. Пробирки закрывают ватными пробками и стерилизуют в автоклаве при двух атмосферах в течение 20 мин. Пересев культуры производят ежедневно. Пробирки с культурой выдерживают 24—36 час. в термостате при 37°, затем переносят в холодильник, где они могут храниться длительное время.

Посевной материал получают из 24—36-часовой культуры на основной среде с 1 $\mu\text{г}$ рибофлавина после центрифугирования или декантирования и перенесения бактериальных клеток в 10 мл стерильного 0,9%-ного раствора NaCl . Эту солевую суспензию используют для засева опытных пробирок. Исходную культуру посевного материала используют лишь один раз. Все манипуляции проводят строго асептически.

Основная среда, на которой выращивается как посевной материал, так и культура в испытываемых пробирках, состоит из следующих компонентов: пептона, глюкозы, уксуснокислого натрия, цистина, дрожжевого экстракта и неорганических солей.

Глюкоза используется безводная, химически чистая. Пептон подвергают для разрушения следов рибофлавина щелочному фотолизу. Для этого к раствору пептона (60 г в 250 мл) прибавляют раствор NaOH (20 г в 250 мл), хорошо перемешивают и переносят в кристаллизатор диаметром 25 см. Кристаллизатор помещают под электролампу в 200 W на расстоянии от нее 0,5 м на 6 час. Температура раствора не должна превышать 25°. Смесь оставляют на 24 часа, после чего рН раствора доводят до 6,6—6,8, прибавляя 27—90 мл ледяной уксусной кислоты; вносят 7 г уксуснокислого натрия и объем раствора доводят до 800 мл. Такой раствор содержит 5% пептона и 6% уксуснокислого натрия.

Дрожжевой экстракт. 100 г автоклавированных дрожжей размешивают в 500 мл воды, прибавляют 150 г уксуснокислого свинца, разведенного в 500 мл воды. К смеси прибавляют раствор аммиака до рН 10. Образующийся осадок фильтруют на воронке Бюхнера, фильтрат подкисляют ледяной уксусной кислотой до слабнокислой реакции по лакмусу и избыток свинца удаляют сероводородом. PbS

фичность, присущую биологическим методам. По сравнению с химическими методами его достоинством является то, что он может применяться и в тех случаях, когда еще неизвестна химическая природа исследуемых веществ, что невозможно для химических методов. Но даже и при возможности применения химических методов, микробиологический метод иногда предпочтительнее химических благодаря большей специфичности и простоте.

Существенным недостатком микробиологического метода является то, что в испытуемых природных материалах, а еще чаще в продуктах их гидролиза, получаемых во время подготовки образцов к анализу, нередко присутствуют вещества, которые могут стимулировать или угнетать рост микроорганизмов вне зависимости от содержания определяемого соединения. С другой стороны, в гидролизат могут переходить не все связанные формы витамина, и в этом случае данные микробиологических определений будут занижены по сравнению с результатами биологических методов.

Рибофлавин является одним из первых витаминов, в отношении которого был разработан микробиологический метод. В сводной статье Снелл [1] приводит подробное описание методов определения рибофлавина при использовании целого ряда микроорганизмов как обычным путем, так и ультрамикрометодом. Следует сказать, что основная среда, на которой выращивают молочнокислые бактерии, в случае определения рибофлавина значительно проще по своему составу, чем для многих других витаминов.

Разрабатывая микробиологический метод определения рибофлавина, мы остановились на методе Снелла с применением молочнокислых бактерий *Lactobacillus casei*. При налаживании метода нам пришлось внести некоторые изменения в предложенную этим автором прописку, что было нами освещено в ранее опубликованной работе [2].

В последнее время мы уделили большое внимание вопросу усовершенствования методики приготовления образцов для анализа, что было вызвано установлением существования прочно связанной с белком формы рибофлавина [3].

Как указывалось выше, недостатком микробиологического метода определения витаминов является то, что микроорганизм получает в качестве питательной среды приготовленную тем или иным способом сильно разбавленную вытяжку. Этим и объясняется тот факт, что несмотря на наличие в разных объектах прочно связанной формы рибофлавина, посредством мик-

робиологического метода она не могла быть обнаружена, так же как и путем применения химического метода.

В настоящее время мы разработали два способа приготовления исследуемых образцов: первый способ дает возможность определить общее содержание рибофлавина, а второй — лишь содержание свободного и легко отщепляемого мононуклеотидного и динуклеотидного рибофлавина. Разность между этими определениями характеризует содержание вновь обнаруженной «прочной связанной» с белком формы рибофлавина*.

Приготовление образца для определения общего содержания рибофлавина

Навеску материала тщательно растирают в ступке с небольшим количеством фосфатного буфера (рН 7,8—8,0). Растертую массу переносят в колбу с добавлением того же буферного раствора таким образом, чтобы общее разведение было около 1 : 15 или 1 : 20, и смесь выдерживают в кипящей водяной бане в течение 45 мин., затем охлаждают до 30°, проверяют значение рН и, в случае сдвига в кислую зону, снова доводят до 7,8—8,0. К смеси добавляют ферментный препарат (трипсин, панкреатин или кларазу) из расчета 30 мг на 1 г сухого вещества и помещают ее в термостат при 37° на 12—16 часов. Затем рН смеси доводят до 5,5—6,0 и разбавляют ее так, чтобы разведение равнялось 1 : 25 или 1 : 30. Вытяжку фильтруют через складчатый фильтр, фильтрат разбавляют до содержания в 1 мл около 0,1 мкг рибофлавина.

Приготовление образца для определения свободного, моно- и динуклеотидного рибофлавина

Для определения этих форм рибофлавина навеску материала тщательно растирают в ступке с небольшим количеством 0,1 н. H_2SO_4 и переносят в колбу, куда добавляют 0,1 п. H_2SO_4 до общего разведения 1 : 15 или 1 : 20. Смесь выдерживают в кипящей водяной бане в течение 45 мин., охлаждают, рН вытяжки доводят до 5,5—6,0, объем доводят до общего разведения 1 : 25 или 1 : 30, смесь фильтруют через складчатый фильтр и фильтрат снова разводят до содержания 0,1 мкг рибофлавина в 1 мл.

* Подробнее о соотношениях различных форм рибофлавина см. нашу статью в этом же сборнике «Флуориметрический метод определения рибофлавина».

связанного с белком рибофлавина. Эти цифры показывают, в каких объектах присутствует вновь обнаруженная форма и насколько больше общее содержание рибофлавина по сравнению с тем, которое определяется по применявшимся ранее методам (табл. 2).

Приведенные данные показывают, что у целого ряда исследованных образцов прочно связанный с белком рибофлавин присутствует в очень больших количествах, достигающих содержания суммы всех остальных его форм. К таким объектам относятся почти все растительные продукты (картофель, овощи, зерновые). Консервы из овощей также содержат некоторое количество этой формы. Из животных объектов вновь обнаруженная форма присутствует в мышцах, значительно меньше ее в печени, в почках она отсутствует.

Дрожжи и низшие грибки не содержат прочно связанной с белком формы рибофлавина.

Следует учитывать, что содержание рибофлавина в исследованных объектах колеблется в зависимости от различных условий произрастания, хранения и т. д., поэтому приведенные данные показывают лишь те пределы, в которых рибофлавин присутствует в тех или иных продуктах.

Литература

1. Warburg O. u. Christian W. Über das gelbe Ferment und seine Wirkung.— *Bioch. Z.*, 254, 438, 1932; 266, 377, 1933.
2. Поволоцкая К. Л. О новой связанной с белком форме рибофлавина.— *Биохимия*, 18, 636, 1953.
3. Bezzeu O. A., Lowry O. H., Love R. H. The fluorometric measurement of the nucleotides of riboflavin and their concentration in tissues.— *J. Biol. Chem.*, 180, 756, 1949.
4. Поволоцкая К. Л. и Скоробогатова Е. П. Сравнение химического и микробиологического методов определения рибофлавина в растительном материале.— *Биохимия*, 18, 79, 1953.
5. Труфанов А. В. и Кирсанова В. А. Рибофлавин и авенин при автолизе дрожжей.— *Биохимия*, 5, 234, 1940.

К. Л. ПОВОЛОЦКАЯ, Е. П. СКОРОБОГАТОВА
и Н. И. ЗАЙЦЕВА

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ РИБОФЛАВИНА

Микробиологический метод количественного определения витаминов получает все более широкое распространение. Принцип метода основан на том наблюдении, что для роста ряда микроорганизмов необходимо присутствие в среде тех или иных витаминов. Используя основную среду, дополненную по известным соотношениям за исключением испытуемого вещества, к этой среде добавляют в одной серии проб возрастающие количества недостающего витамина, а в параллельной серии — возрастающие количества вытяжки из испытуемого образца и на основании сопоставления ростового эффекта в двух сериях опыта вычисляют содержание интересующего вещества и анализируемого материала.

В качестве микроорганизмов используются различные бактерии, дрожжи и плесневые грибки. Молочнокислые бактерии являются особенно подходящими для этой цели вследствие того, что среди них найдены штаммы, нуждающиеся в самых разнообразных витаминах. Они легко растут на синтетических и полусинтетических средах, не требуют специальной аэрации и не являются патогенными.

Ростовой эффект может быть определен по возрастанию числа клеток путем прямого подсчета или по мутности среды, а также по определению образующихся продуктов обмена, например, в случае молочнокислых бактерий путем титрования молочной кислоты.

Микробиологический метод имеет существенные преимущества по сравнению с биологическими методами определения на животных в отношении быстроты, малой затраты труда и материалов, сохраняя в то же время в значительной мере специ-

Ингредиенты вводят в указанной последовательности в колбу с 500—600 мл дистиллированной воды, перемешивая каждый раз. Затем доводят водой почти до одного антра, добавляют 5 н. NaOH до pH 6,8 и добавляют воду точно до антра.

V. Выращивание исходной культуры *Streptococcus faecalis*

К 90 мл дистиллированной воды добавляют 10 мл дрожжевого автолизата*, 1 г глюкозы и 1,5—2 г агар-агара. Готовят смесь в водяной бане до растворения агара, разливают по пробиркам еще горячий раствор, закрывают пререзиневыми пробками и стерилизуют в автоклаве при давлении, равном 1 атм. в течение 15 минут, охлаждают и выдерживают в положении. Засевают не менее 2—3 пробирок культурой *Streptococcus faecalis*. После выдерживания пробирки в термостате в течение 16—24 час. при 37° их переносят в холодильник, где и сохраняют. Таким образом получают исходный штамм культуры микроорганизма. Если же для исходной культуры готовят не менее одного раза в неделю.

VI. Приготовление стандартного раствора фолиевой кислоты

Основной раствор фолиевой кислоты (100 мг/мл) готовят растворением 10 мг чистой фолиевой кислоты (не содержащей флуоресцирующих примесей) в дистиллированной воде с добавлением 1—2 капель 5 н. NaOH и доведением объема в мерной колбе до 100 мл. Раствор хранят в холодильнике под слоем толуола. Затем делают дальнейшие разведения: берут 1 мл основного раствора, переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят водой до метки. Этот раствор, содержащий в 1 мл 1 мкг, может храниться в холодильнике под слоем толуола не более одного месяца. В день опыта 2 мл. последнего раствора доводят в мерной колбе до 100 мл дистиллированной водой. Отсюда берут 10 мл и снова доводят до 100 мл дистиллированной водой. В 1 мл этого раствора содержится 0,002 мкг фолиевой кислоты, его используют для получения стандартной кривой (стандартный раствор фолиевой кислоты).

* Приготовление см. на стр. 140. Полученный дрожжевой автолизат разливают по пробиркам и стерилизуют при давлении, равном 1 атм., в течение 15 минут.

VII. Приготовление культуральной среды

В пробирки вносят по 5 мл основной среды, по 5 мл стандартного раствора фолиевой кислоты (1 мл содержит 0,002 мкг фолиевой кислоты) и стерилизуют в течение 15 мин. при давлении, равном одной атмосфере.

VIII. Приготовление посевного материала

За сутки до постановки опыта пробирки с культуральной средой (обычно две-три) засевают культурой *Streptococcus faecalis* и ставят в термостат на 20—24 часа при 37°. Затем бактериальную массу асептически переносят в стерильные центрифужные пробирки и центрифугуют в течение 10—15 минут. Жидкость сливают, а осадок промывают 10 мл стерильного 0,9%-ного раствора NaCl, отцедиют, центрифугируют и снова суспендируют в 20 мл 0,9%-ного стерильного раствора NaCl.

IX. Постановка опыта

1. Приготовление пробирок для стандартной кривой.

Берут 24 пробирки одинакового размера (наиболее удобным размером является 18×140 мм).

Первые три пробирки оставляют пустыми, во вторые три пробирки вносят по 0,5 мл стандартного раствора фолиевой кислоты, т. е. по 0,001 мкг, в третьи — по 1 мл раствора, т. е. по 0,002 мкг, и в четвертые — по 1,5 мл, т. е. по 0,003 мкг фолиевой кислоты, и так далее. В последние пробирки вносят по 4 мл раствора фолиевой кислоты. Во все пробирки наливают по 5 мл основной среды и до 10 мл доливают дистиллированной водой, т. е. в первые три пробирки вносят по 5 мл воды, во вторые — по 4,5 и так далее.

2. Приготовление пробирок с испытуемым раствором.

Для каждого образца берут 10 пробирок. В первые две параллельные пробирки наливают по 0,5 мл испытуемого раствора, во вторые — по 1 мл, в третьи — по 1,5 мл, в четвертые — по 4 мл и в пятые — по 5 мл. В каждую пробирку прибавляют по 5 мл основной среды и доводят до 10 мл дистиллированной водой.

Все пробирки закрывают резиновыми пробками и автоклавируют прямо в штативах при давлении, равном 1 атм., в течение 15 минут. После охлаждения каждую пробирку засевают одной каплей посевного материала и оставляют в термостате при 37° на 40—48 часов.

в автоклаве при давлении, равном 1 атм., в течение 20 мин. или сохраняют в холодильнике под слоем толуола.

2. Казеиновый ферментативный гидролизат. 50 г измельченного казеина растворяют в 800 мл 0,8%-ного Na_2CO_3 . К полученной гомогенной суспензии добавляют 250 мг панкреатина (или трипсина). Смесь покрывают тонким слоем толуола и помещают на 48 час. в термостат при 37°. Затем смесь прогревают текучим паром в автоклаве в течение 20 минут. После охлаждения pH гидролизата доводят ледяной уксусной кислотой до 6 и фильтруют с отсасыванием. Раствор встряхивают в течение 30 мин. с 30 г активированного угля, фильтруют и после доведения pH до 3,8 еще раз встряхивают с 12 г угля. Каждый раз фильтры промывают небольшими порциями воды и промывные воды присоединяют к фильтрату.

Объем гидролизата доводят до 1 л, разливают его в колбы по 50—100 мл и стерилизуют в автоклаве при одной атмосфере в течение 20 мин. или же хранят в холодильнике под слоем толуола.

3. Раствор d1-триптофана. 1 г d1-триптофана растворяют в 30—40 мл 10%-ной HCl и доводят до 200 мл. Сохраняют в холодильнике под слоем толуола.

4. Раствор l-цистина. 1 г l-цистина растворяют в 40 мл 10%-ной HCl и добавляют дистиллированную воду до 200 мл. Сохраняют в тех же условиях, как и раствор триптофана.

5. Раствор аденин-гуанин-урацила. Отвешивают по 0,1 г аденинсульфата, гуанин-гидрохлорида, урацила и растворяют в мерной колбе в 20%-ной HCl при длительном нагревании в кипящей водяной бане, доводят после охлаждения до 100 мл и сохраняют в холодильнике.

6. Растворы витаминов. Отвешивают по 10 мг:

- 1) тиамин-гидрохлорида,
- 2) пантотената кальция,
- 3) пиридоксин-гидрохлорида,
- 4) рибофлавина,
- 5) никотиновой кислоты,
- 6) n-аминобензойной кислоты,

растворяют отдельно каждый витамин в дистиллированной воде и доводят до 100 мл в мерных колбах.

Рибофлавин растворяют при нагревании в кипящей бане. Растворы рибофлавина и пиридоксина необходимо сохранять в темных склянках.

Все растворы витаминов сохраняют в холодильнике под слоем толуола.

7) Раствор биотина готовят с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержалось 0,2 мкг. Раствор разливают в пробирки и стерилизуют в автоклаве при 1 атм. в течение 15 мин.

7. Раствор солей (A). Растворяют 25 г одноосновного фосфорнокислого калия (K_2HPO_4) и 25 г двуосновного фосфорнокислого калия (K_2HPO_4) в 250 мл дистиллированной воды. Раствор сохраняют в холодильнике.

Раствор солей (B). Растворяют 10 г сернокислого магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,5 г хлористого натрия (NaCl), 0,5 г сернокислого железа ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и 0,5 г сернокислого марганца ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Объем доводят до 250 мл. Раствор сохраняют в холодильнике.

IV. Приготовление сеновой питательной среды

Таблица 1

Состав основной питательной среды на 1 л

Наименование составных частей	Весовое количество	В миллилитрах исходных растворов
Глюкоза	20 г	—
Натрий уксуснокислый ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	33	—
Казеиновый гидролизат казеиновый	9	90
Казеиновый гидролизат ферментативный	1	20
l-цистин	0,2 г	40
d1-триптофан	0,2	40
Аденин, урацил, гуанин	по 0,02 г каждого	20
Тиамин-гидрохлорид	0,45 мг	4,5
Пантотенат кальция	0,45	4,5
Рибофлавин	0,45	4,5
Никотиновая кислота	0,45	4,5
n-аминобензойная кислота	0,1	1
Пиридоксин	1,0	10
Биотин	0,002	10
Раствор солей (A)	1 г	10
K_2HPO_4	1 г	10
Раствор солей (B)	0,4 г	—
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02	—
NaCl	0,02	—
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02	—
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,02	—

О. И. ПУШКИНСКАЯ и Л. С. КУЦЕВА

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ

При микробиологическом определении фолиевой кислоты пользуются штаммами *Lactobacillus casei* или *Streptococcus faecalis* [1, 2].

Мы испытывали оба штамма и нашли, что они позволяют количественно определять этот витамин. *L. casei* более чувствителен, чем *S. faecalis*, что является его преимуществом, однако этот организм более требователен к составу среды и условиям выращивания, чем *S. faecalis*, и потому в обычной лабораторной практике менее предпочтителен.

Оба штамма микроорганизмов одинаково реагируют как на фолиевую, так и на фолиновую кислоту, поэтому обе кислоты при использовании этих штаммов определяются суммарно.

В настоящей статье дается описание микробиологического метода определения фолиевой кислоты с молочнокислой бактерией *Streptococcus faecalis*.

Микробиологический анализ распадается на следующие 11 этапов.

I. Приготовление препарата фермента конъюгазы

Навеску поджелудочной железы курицы или почки свиньи (10—20 г) измельчают (почки свиньи предварительно механически очищают от жира) и тщательно растирают в ступке с трехкратным количеством воды. Вытяжку отделяют центрифугированием и разливают в пробирки по 5—10 мл.

Раствор хранят в холодильнике в замороженном состоянии. При этом часть белков выпадает в осадок, в качестве источника фермента используется прозрачная жидкость.

II. Подготовка испытуемого образца для анализа

В связи с тем, что фолиевая кислота в исследуемых образцах находится в основном в виде конъюгатов, недоступных бактериям, необходима предварительная ферментативная обработка материала специфическими ферментами — конъюгазами. Мы пользовались ферментными препаратами из поджелудочной железы курицы, оптимум действия которых лежит при pH 7, и из почки свиньи — с оптимумом действия при pH 5.

Навеску образца (0,1—0,5 г) тщательно растирают и переносят в 10 мл буферного раствора (1%-ным раствором ацетата натрия — pH 5 или фосфатным буфером — pH 7 в зависимости от применяемого фермента) в эрленмейеровскую колбу на 50 мл. После пятиминутного кипячения в водяной бане и охлаждения раствора к нему добавляют фермент из расчета 1 мл на 20 мг сухого остатка образца, три капли толуола и смесь ставят на 24 часа в термостат при 37°. Затем, после инактивации действия фермента пятиминутным кипячением в водяной бане и охлаждения, при помощи 0,5 н. раствора NaOH устанавливают pH смеси 6,8, а ее объем доводят дистиллированной водой до 100 мл. Раствор фильтруют и разводят таким образом, чтобы 1 мл содержал приблизительно 0,001 мг фолиевой кислоты. Параллельно ставят контрольный опыт для учета содержания фолиевой кислоты в ферментной вытяжке.

III. Приготовление растворов для основной среды

1. Казеиновый кислотный гидролизат. 100 г казеина смешивают в литровой колбе с 500 мл 20%-ной соляной кислоты. Смесь нагревают с обратным холодильником в течение 24 часов. Первые пять-восемь часов нагревание производят в водяной бане, а затем на плитке с асбестовой сеткой. Из полученного гидролизата при пониженном давлении отгоняют HCl. К густому остатку добавляют 300 мл дистиллированной воды и снова отгоняют до густоты сиропа. Указанную операцию повторяют еще раз.

Растворяют оставшуюся массу приблизительно в 100 мл дистиллированной воды, доводят pH до 3,5 посредством 5 н. NaOH, объем доводят водой до 1 л, добавляют 20 г активированного древесного угля и встряхивают в течение одного часа; затем фильтруют с отсасыванием. Еще раз повторяют обработку углем и получают бесцветный или слабожелтый раствор. Разливают раствор в колбы, по 100 мл в каждую, и стерилизуют

В фильтрате измеряют интенсивность флуоресценции с указанным выше светофильтром.

Интенсивность флуоресценции испытуемой вытяжки сравнивают с интенсивностью флуоресценции стандартного раствора фолиевой кислоты.

Основной раствор фолиевой кислоты готовят растворением 20 мг предварительно перекристаллизованной кислоты в 100 мл воды, слегка подщелоченной 10%-ным раствором NaOH (на 100 мл 3 капли). Раствор хранят в темной склянке под толуолом на холоду. Перед определением из него готовят стандартный раствор путем разведения 1 мл до 100 мл. Из этих 100 мл на определение берут 10 мл, pH раствора доводят до 3 и раствор обрабатывают $KMnO_4$ и H_2O_2 подобно опытной вытяжке. После этого pH устанавливают в пределах 4–4,5, объем раствора доводят до 20 мл, раствор фильтруют и определяют в нем флуоресценцию. В 1 мл стандартного раствора таким образом, содержится 1 мкг фолиевой кислоты.

Так как применяемые реактивы обладают некоторой флуоресценцией, необходимо ставить холостой опыт, показания которого вычитают из показаний опытного образца. Холостой опыт проводят по той же самой прописи, но без испытуемого образца.

Содержание фолиевой кислоты выражают в микрограммах на 1 г испытуемого материала, расчет ведут по следующей формуле:

$$X = \frac{(a_1 - a_2) \cdot B \cdot v}{a_3 \cdot P}$$

где: a_1 — показание гальванометра для испытуемого образца;
 a_2 — показание гальванометра для холостого опыта;
 a_3 — показание гальванометра для стандартного раствора;
 B — содержание фолиевой кислоты в стандартном растворе в микрограммах на 1 мл (обычно 1 мкг);
 v — конечный объем (в мл) вытяжки, флуоресценцию которой измеряют;

P — навеска материала (в г) с учетом разбавлений.

В случае высокобелковых продуктов, таких, как печень, дрожжи, бобовые продукты, оказалось, что фолиевая кислота из них полностью не извлекается указанным выше способом, поэтому необходимо дополнительное проведение ферментативной обработки.

При ферментативной обработке можно применять такарнастаз, полиферментный патентованный препарат типа «нолида-

зы» или высушенный мицелий гриба пенициллиума, как это было предложено К. И. Новолоцкой и Е. П. Скоробогатовой [12].

Техника ферментативной обработки сводится к следующему. Полученную первоначально водную вытяжку охлаждают, pH доводят до 4,5 и затем к ней добавляют 100 мг ферментативного препарата. Вытяжку с добавленным ферментным препаратом ставят в термостат при 40–45° на ночь, после чего ее pH доводят до 3, а общий объем до 100 мл, фильтруют, для дальнейшей обработки берут 50–75 мл фильтрата. Обработку ведут так, как указано выше.

При ферментативной обработке к холостому опыту добавляют фермент.

Результаты определения фолиевой кислоты в чистых растворах при их обработке по описанному методу приведены в табл. 1. Для опытов брали 50 мл чистых растворов с общим содержанием фолиевой кислоты в пределах от 10 до 200 мг.

После обработки конечный объем элюата, используемого для определения флуоресценции, во всех случаях был равен 10 мл с концентрацией в нем фолиевой кислоты от 1 до 20 мкг в 1 мл.

Таблица 1

Определение фолиевой кислоты в чистых растворах

Взвешивание кислоты в мг	Найдено при определении	
	в мг	в % от исходного количества
1	1,0	100
2	2,0	100
3	2,8	93,3
5	4,0	80
10	8,0	80
20	14,5	72,5

Из таблицы видно, что небольшие количества фолиевой кислоты (1–3 мкг) определялись полностью, при более высоком ее содержании наблюдались потери, доходившие до 20–25% исходного количества.

ниям с потерей при его восстановлении флуоресценции и обратном ее появлении при окислении.

Максимумы абсорбции фолиевой кислоты в 0,1 н. NaOH лежат при 257, 282 и 365 м μ . Соответствующие коэффициенты поглощения $E_{1\%}^{1\text{см}}$ равны 585, 570 и 206.

Специфическим симптомом недостатка фолиевой кислоты в организмах человека и животных является нарушение функций кроветворения, выражающееся в развитии анемии, лейкопении, цитопении, т. е. в уменьшении красных и белых клеток крови и задержке в созревании форменных элементов крови. Сопровождающие признаки — задержка в росте организма, снижение его веса и ряд побочных признаков. Установление кроветворной функции фолиевой кислоты в опытах на животных послужило основанием для терапевтического ее применения.

Значение фолиевой кислоты определяется не только ее ценным физиологическим действием при лечении и предупреждении анемии у человека, но и большим ее значением для сельскохозяйственных животных. Она необходима также микроорганизмам, например, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrückii* и др.

До недавнего времени существовал только микробиологический способ определения фолиевой кислоты с использованием в качестве индикаторных микроорганизмов *Lactobacillus casei* и *Streptococcus faecalis* (см. статью Пушкинковой и Купцовой в этом сборнике). В 1949 г. нашей лабораторией был разработан метод химического определения фолиевой кислоты [11], основанный на адсорбции ее из вытяжек активированным углем, окислении десорбированного витамина перманганатом калия с целью перевода в флуоресцирующее производное и изменении интенсивности флуоресценции в области максимума свечения (470 м μ) по сравнению со стандартным раствором.

ОПИСАНИЕ ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ

Навеску материала берут с таким расчетом, чтобы в 1 мл вытяжки, назначенной для определения флуоресценции, содержалось не более 2—3 μ г фолиевой кислоты. Обычно берут для этого навески дрожжей и печени — 1—2 г, зерновых продуктов — 5—10 г и овощей и фруктов — 40—20 г.

Навеску материала тщательно растирают с кварцевым песком, переносят в колбу, заливают 75 мл воды и выдерживают в кипящей бане в течение 45 минут. После охлаждения объем жидкости доводят до 100 мл и вытяжку фильтруют. Для дальнейшей обработки берут 50—75 мл фильтрата с точным учетом объема. Вытяжку подкисляют до pH 3 серной кислотой (2%), затем для адсорбции фолиевой кислоты добавляют 100 мг предварительно обработанного анилином активированного угля для уменьшения прочности адсорбции фолиевой кислоты и для облегчения ее элюции, а также для отделения многих флуоресцирующих примесей. Обработка анилином состоит в том, что уголь заливают 10-кратным количеством 40%-ного водного раствора анилина, кипятят на электрической плитке под тягой при помешивании в течение одного часа, промывают 5—6 раз дистиллированной водой, сушат при 30—40° и хранят в закрытой склянке.

Анализируемую вытяжку с добавленным углем, обработанным как указано выше, кипятят 5 минут в тех же условиях и затем уголь отфильтровывают в вакууме через фильтр Шотта № 2 или на аналогичном стеклянном фильтре отечественного производства. Десорбцию витамина проводят нагретым до кипения 3%-ным раствором аммиака в 70%-ном спирте 5 раз на том же фильтре Шотта. Уголь смывают с фильтра, переводят в колбу и вновь подвергают такому же кипячению, как и в начале, затем переносят на тот же фильтр, отфильтровывают, вновь переносят уголь в колбу и кипятят еще раз, переносят на фильтр и 3 раза промывают указанным горячим раствором прямо на фильтре. Спирт предварительно проверяют на отсутствие флуоресценции; в случае ее наличия спирт необходимо перегнать. Общее количество элюирующей смеси равняется 70 мл, из них на первую десорбцию берут 20 мл, на вторую и третью — по 15 мл, на четвертую и пятую — по 10 мл.

Соединенные порции элюатов помещают в перегонную колбу со стеклянным шпифом и отгоняют примерно до объема 10—15 мл, после чего pH остатка доводят 2%-ной H_2SO_4 до 3 и вытяжку подвергают обработке 4%-ным раствором KMnO_4 , который добавляют по каплям до исчезновения розовой окраски. Смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин., к концу которых она несколько бурее, но слабо-розовый оттенок сохраняется. После этого добавляют по каплям 3%-ную H_2O_2 для удаления избытка перманганата. Затем pH вытяжки доводят до 4—4,5, измеряют ее объем и фильтруют.

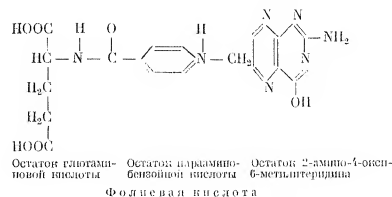
11 Витаминные ресурсы.

П. А. АНДРЕЕВ

ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ

Фолиевая кислота, или птеронилглутаминовая кислота, — водорастворимый витамин, входящий в группу витаминов В. Она находится во многих пищевых продуктах, особенно ее много в печени, дрожжах и зеленых листьях. Впервые фолиевая кислота была описана в 1935 г. при пищевой недостаточности у обезьян и была названа витамином «М» [1]. В 1939 г. Хоган и Паррот описали случаи анемии у цыплят при недостатке в диете какого-то неизвестного «фактора», который они назвали витамином «В₁₂» [2]. В 1941 г. Стокстед и его сотрудники сообщили, что этот фактор необходим при выращивании *Lactobacillus casei* и назвали его «*Lactobacillus casei* factor» [3]. В этом же году Митчелл и Смелл изолировали кристаллический компонент из шпината и назвали его фолиевой кислотой от латинского слова *folium* — лист [4]. Последующие работы показали, что все эти вещества идентичны, их стали называть общим термином — фолиевая кислота. После выделения из печени кристаллической фолиевой кислоты Англером с сотр. в 1946 г. [5] была установлена [6] структурная формула этого вещества, и было показано, что в нее входят: 1) птеридин, 2) п-аминобензойная кислота и глутаминовая кислота.

Как видно из формулы, п-аминобензойная кислота связана своей аминной группой с птеридином в положении 6 через метиленовый мостик, а своей карбоксильной группой связана с аминной группой глутаминовой кислоты. Четыре метода синтеза этого соединения были опубликованы в 1948 г. [6, 7, 8 и 9]. Затем были так же изолированы из природных материалов вещества с тремя и семью остатками глутаминовой кислоты [10], получившие соответственно названия — птеронилтриглутаминовая кислота и птеронилсемьглутаминовая кислота.



Чистые препараты фолиевой (птеронилмоноглутаминовой) кислоты представляют собой желто окрашенные иглообразные кристаллы, не имеющие точки плавления, состава $C_{19}H_{19}O_6N_7$, мол. вес 441,4. Растворимость фолиевой кислоты весьма ограничена, составляя около 100 мг% в кипящей воде и около 0,16% в воде, подкисленной до pH 3 при 25°.

Фолиевая кислота слегка растворима в десятиной уксусной кислоте, метиловом спирте, менее растворима в этилолом и бутиловом спиртах, нерастворима в ацетоне, эфире, петролейном эфире и хлороформе. Аммонийная, натриевая и бариевая соли хорошо растворимы в водных спиртах и весьма растворимы в воде.

Фолиевая кислота осаживается из водных растворов уксуснокислым свинцом, азотнокислым серебром, а также солями меди, ртути, железа, бария, цинка, фосфорновольфрамовой кислотой. Она хорошо адсорбируется активированным углем, различными сортами фуллеровой земли, бентонитом, флоризилом и другими адсорбентами. Она способна количественно десорбироваться 3—5%-ными растворами аммиака.

Выдающимся свойством фолиевой кислоты является ее способность к обратимым окислительно-восстановительным превращениям. При воздействии гидросульфита она восстанавливается с потерей желтой окраски, а при встряхивании на воздухе вновь переходит в окисленную форму. Флуоресценцией сама по себе фолиевая кислота не обладает, но при воздействии таких окислителей, как перманганат, от нее отщепляется п-аминобензойная кислота вместе с глутаминовой и образуется птеридилшестикарбоновая кислота (или альдегид), обладающая интенсивной голубой флуоресценцией с максимумом свечения при 470 мμ. Это флуоресцирующее производное также способно к обратимым окислительно-восстановительным превраще-

3. Колбочки засевают таким же количеством индикаторной культуры, как и при составлении стандартной кривой, и ставят на 40—48 час. в термостат при 27°.

4. По сухому весу культуры, собранной так же, как указано в разделе I (п. 5), устанавливают, пользуясь стандартной кривой, содержание пантотеновой кислоты в миллилитре индикаторной среды. Зная степень разведения, вычисляют количество витамина в образце.

Определение β-аланина

Если для роста *S. Ludwigii* необходима полная молекула пантотеновой кислоты, то дрожжевые культуры *Saccharomyces cerevisiae* XII и *Saccharomyces cerevisiae* «Gebrüder Meyer» довольствуются лишь β-аланином. Определение β-аланина проводят по методу, применяемому для определения пантотеновой кислоты, со следующими отличиями:

1) Индикаторными культурами служат *Saccharomyces cerevisiae* XII или *Saccharomyces cerevisiae* «Gebrüder Meyer».

2) На один литр среды Ридер добавляют витаминны, необходимые для неиспользуемых индикаторных культур, в следующем количестве:

биотин	— 2 мкг
витамин В ₁	— 1 мг
витамин В ₆	— 100 мкг
никотиновая кислота	— 1 »
т-инозит	— 3 мг

3) В колбочки с индикаторной средой добавляют вместо пантотеновой кислоты соответствующие количества β-аланина.

ВЫВОДЫ

1. Предложен микробиологический метод определения пантотеновой кислоты при помощи дрожжевого организма *Saccharomyces Ludwigii* KM.

2. Индикаторная культура нуждается в получении извне биотина, витаминов В₁ и В₆, никотиновой кислоты и полной молекулы пантотеновой кислоты, которая не может быть заменена ее составными компонентами или их смесью.

3. Описываемый метод дает возможность определять от 0,001 до 0,008 мкг пантотеновой кислоты в миллилитре испытуемого раствора.

4. Дрожжевой метод значительно проще и доступнее по сравнению с известными методами, в которых используются бактериальные индикаторные культуры.

5. Для определения β-аланина применены дрожжевые культуры *Saccharomyces cerevisiae* XII и *Saccharomyces cerevisiae* «Gebrüder Meyer».

Литература

1. Jukes T. H. The distribution of pantothenic acid in certain products of natural origin. — J. nutrition, 21, 193, 1941.
2. Strong F. M., Feeney R. E. a. Earle A. Microbiological assay for pantothenic acid. Ind. eng. chem., Anal. ed., 13, 566, 1941.
3. Neal A. L. a. Strong F. M. Microbiological determination of the pantothenic acid. — Ind. eng. chem., Anal. ed., 15, 654, 1943.
4. Skeggs H. R. a. Wright L. D. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid. — J. biol. chem., 156, 21, 1944.